

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

Date of mailing (day/month/year)
03 May 2001 (03.05.01)

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

International application No.	Applicant's or agent's file reference
PCT/EP00/08116	D 2724
International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
18 August 2000 (18.08.00)	20 August 1999 (20.08.99)

Applicant
SCHAWALLER, Manfred et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

01 March 2001 (01.03.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Céline Faust

Authorized officer	Céline Faust
Telephone No.: (41-22) 338.83.38	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna
nal Application No
PCT/EP 00/08116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N21/55

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, INSPEC, COMPENDEX, IBM-TDB, FSTA, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 451 434 A (HART) 29 May 1984 (1984-05-29) column 4, line 62 -column 5, line 31 figures 5,6 ---	1-4,6-9, 17,20, 22-25
A	US 5 300 423 A (ZOHA) 5 April 1994 (1994-04-05) column 5, line 55 -column 6, line 24 column 7, line 1 - line 3 column 7, line 12 - line 14 figure 3 ---	1-4,6-9, 13 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

4 January 2001

11/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thomas, R.M.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten nal Application No
PCT/EP 00/08116

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 96 09532 A (ABBOTT LABORATORIES) 28 March 1996 (1996-03-28)</p> <p>page 1, paragraphs 1,2</p> <p>page 2, line 4 - line 5</p> <p>page 10, line 3 - line 9</p> <p>page 12, line 29 - line 34</p> <p>page 21, line 30 -page 22, line 29</p> <p>column 23, line 4 - line 12</p> <p>column 30, last line -column 31, line 2; figure 1</p> <p>-----</p>	1-4, 6-9, 17, 22-25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatinal Application No

PCT/EP 00/08116

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 4451434	A 29-05-1984	US 4271139 A		02-06-1981
		DE 2912089 A		11-10-1979
		GB 2032101 A,B		30-04-1980
		IT 1193295 B		15-06-1988
		JP 54157680 A		12-12-1979
		JP 63001545 B		13-01-1988
		US 4382074 A		03-05-1983
		US 4388296 A		14-06-1983
US 5300423	A 05-04-1994	US 5192510 A		09-03-1993
		CA 2059394 A		31-07-1992
		WO 9318405 A		16-09-1993
WO 9609532	A 28-03-1996	US 5599668 A		04-02-1997
		AU 3636295 A		09-04-1996
		CA 2197321 A		28-03-1996
		EP 0783683 A		16-07-1997
		JP 10506190 T		16-06-1998
		US 5843651 A		01-12-1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70) **10/049975** UC14 Rec'd PCT/PTO 06 MAY 2002

7

Applicant's or agent's file reference D 2724	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/08116	International filing date (day/month/year) 18 August 2000 (18.08.00)	Priority date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 21/55		
Applicant STIFTUNG FÜR DIAGNOSTISCHE FORSCHUNG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

RECEIVED

MAY 06 2002

GROUP 3600

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

RECEIVED

APR 26 2002

101700

Date of submission of the demand 01 March 2001 (01.03.01)	Date of completion of this report 26 November 2001 (26.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REC'D-INITIAL PROCESSING

MAY 13 2002

RECEIVED

I Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages 1-24, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages 1-26, filed with the letter of 05 November 2001 (05.11.2001)

 the drawings:

pages 1/4-4/4, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. 5

because:

the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. see separate sheet are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08116

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

No establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability for Claim 5 (see Box VIII).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08116

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-4, 6-17, 19-22, 25, 26	YES
	Claims	18, 23, 24	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-4, 6-17, 19-22, 25, 26	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-4, 6-26	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Cited documents:

D1: US-A-4 451 434 (HART) 29 May 1984 (1984-05-29)
 D2: US-A-5 300 423 (ZOHA) 5 April 1994 (1994-04-05)
 D3: WO-A-96/09532 (ABBOTT LABORATORIES) 28 March 1996 (1996-03-28)
 D4: Sensors and Actuators B 29 (1995), pages 307-311

1. Novelty (PCT Article 33(2))

1.1. Claim 18

D2 describes a cuvette for use in the method according to one of Claims 1 to 16 (Figure 1, (26)); column 2, line 61 to column 3, line 19), which comprises at least one coreactant for the substance to be determined bound to a surface (column 5, lines 60-63; Figure 3) and which consists of synthetic material (film used to form the cuvette is for example polyvinyl chloride or polystyrene; column 5, lines 35, 36).

Claim 18 is thus not novel with respect to D2.

1.2. Claim 23

D2 describes solutions containing at least one fluorophore-containing compound (Figure 3, (42); column 5, line 64), at least one dye (column 7, lines 12-14) and optionally a coreactant (Figure 3, (46)).

Claim 23 is thus not novel in light of D2.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1.3. Claim 24

D2 describes a kit for use in a method according to one of Claims 1 to 16, comprising at least one cuvette according to Claim 18 (see 1.1.) and/or a solution according to Claim 23 (see 1.2.). Claim 24 is thus not novel in light of D2.

2. Inventive Step (PCT Article 33(3))

2.1. Claim 1

Document D1, which is the closest prior art, discloses a method for determining substances, comprising the following steps:

- making available a surface that comprises at least one coreactant R¹ (Figure 6, (522)) bound to the surface (Figure 6, (519)) (Figure 6; column 5, lines 18-31);
- contacting the surface with a solution that comprises at least the substance to be determined, at least one fluorophore-containing compound (column 5, lines 6-31) and at least one dye, which absorbs the fluorophore (Figure 6, (516)), where on the coreactant R¹ on the surface a complex develops that comprises at least one fluorophore-containing compound; and
- exciting the fluorophore bound to the surface by means of the evanescence field of a light source and measuring the fluorescence generated (column 4, line 62 to column 5, line 31: "complete internal reflection," "... it is known from the more advanced theory of physical optics that the radiation field of the beam ..."; Figure 6, (515));

from which the subject matter of Claim 1 differs in that the complex next to the coreactant R¹ comprises at least the substance to be determined and a fluorophore-containing compound and absorbs the dye in the emission field.

The problem to be solved by the present invention can thus be seen as that of making available a method in which the substance to be determined is not subjected to conformation alterations through direct binding to the surface. So-called "sandwich" assay formats are known to a person skilled in the art who works in the field of ELISA (enzyme immunoassay) technology. Furthermore, an assay of this type (Figure 3a) is described in connection with evanescent detection in D2. Using the "sandwich" technology, the substance to be determined must not be immobilized directly on the surface, rather it is, for example, bound to the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

surface via an antibody. A person skilled in the art can transfer this method directly to the method according to D1 without thereby undertaking any design modifications to the technical structure.

The second problem to be solved by the present invention can be seen as that of reducing interference with fluorescent molecules from the environmental medium (bulk).

From D2 (column 7, lines 12-14), it is also known to a person skilled in the art that by adding a dye that absorbs in the absorption range of fluorophore interference with fluorescent molecules from the environmental medium (bulk) can be reduced.

The method is thus suggested by D1 in conjunction with D2.

2.2. Dependent Claims

Dependent Claims 2-4, 6-17, 19-22, 25 and 26 contain no additional features which, combined with the features of any claim to which they refer, meet the PCT requirements for novelty and inventive step. The reasons are as follows:

- Claims 2-4, 8

D2 describes a method by which the substance to be determined, as coreactant R^2 , binds to coreactant R^1 on the surface (Figure 1); coreactant R^1 is an antibody in this case.

- Claim 6

D4 describes a method by which the coreactant R^1 comprises streptavidin and coreactant R^2 comprises biotin and a binding site for the substance to be determined (page 309, 4.2).

- Claim 7

Hormones, proteins, viruses, bacteria, pharmaceuticals or toxins are usually detected using the usual ELISA method. A person skilled in the art who knows the method from D1 and D2 will use the advantages of the evanescent

THIS PAGE BLANK (USPTO)

technology, namely economizing on the washing and pipette steps, and employ the above substance classes for the detection.

- Claims 9, 10

D4 describes a method by which the fluorophore-containing compound has a fluorescent compound and a binding site for the substance to be determined (page 309, 4.2: fluorescein labeled streptavidin).

- Claim 14

D2 describes a phosphorized compound as a fluorophore (column 7, line 2).

- Claims 11-17

The use of suitable fluorophores and dyes does not represent an inventive step for a person skilled in the art since the claimed dyes or fluorophores are commercially available and their properties are known to the person skilled in the art.

- Claims 19-22

The cuvettes and microtiter plates known from the claimed materials in a specific size and shape are known to a person skilled in the art and are commercially available.

- Claims 25 and 26

The use of the method and thus the utilization of the advantages of evanescent excitation (lower number of washing and pipette steps) according to one of Claims 1 to 17 for determining the reaction kinetics of immunological reactions (Claim 25) or in diagnostics (Claim 26) known to a person skilled in the art from ELISA technology does not require an inventive step from a person skilled in the art since there is a need in these fields to use these methods.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claim 5 does not make clear which assay format is being described.
2. The vague and imprecise statement on pages 6, (3) and (4) of the description gives the impression that the subject matter for which protection is sought does not correspond to the subject matter defined in the claims. Consequently, there is a lack of clarity (PCT Article 6) when the claims are interpreted on the basis of the description (cf. PCT Guidelines, Chapter III-4.3a).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT) T16



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts D 2724	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08116	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 18/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 20/08/1999

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK
G01N21/55

Anmelder

STIFTUNG FÜR DIAGNOSTISCHE FORSCHUNG

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser **BERICHT** umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht **ANLAGEN** bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

I Grundlage des Berichts
II Priorität
III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
VI Bestimmte angeführte Unterlagen
VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 01/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 26.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Klee, B Tel. Nr. +49 89 2399 2675



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VOLLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08116

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-24 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-26 eingegangen am 05/11/2001 mit Schreiben vom 05/11/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderlicher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- die gesamte internationale Anmeldung.
- Ansprüche Nr. 5.

Begründung:

- Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONALER VOLLAUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08116

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuartigkeit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-4, 6-17, 19-22, 25, 26
	Nein: Ansprüche	18, 23, 24
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-4, 6-17, 19-22, 25, 26
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-4, 6-26
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. Zitierte Referenzen

D1: US-A-4 451 434 (HART) 29. Mai 1984 (1984-05-29)
D2: US-A-5 300 423 (ZOHA) 5. April 1994 (1994-04-05)
D3: WO 96 09532 A (ABBOTT LABORATORIES) 28. März 1996 (1996-03-28)
D4: Sensors and Actuators B 29 (1995) 307-311

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

2. Zu Anspruch 5 (Siehe VIII).

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

3. Neuheit (Art.33(2) PCT)

3.1 Zu Anspruch 18

D2 beschreibt eine Küvette zur Verwendung in dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 (Figur 1 (26), Spalte 2, Zeile 61 bis Spalte 3, Zeile 19), welche mindestens einen Reaktionspartner für die zu bestimmende Substanz an einer Oberfläche gebunden umfaßt (column 5, line 60-63, figure 3) und aus Kunststoff besteht (film used to form the cuvette is for example polyvinyl chloride or polystyrene; column 5, line 35, 36).

Somit ist Anspruch 18 nicht neu in Bezug auf D2.

3.2 Zu Anspruch 23

D2 beschreibt Lösungen, enthaltend mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung (Figur 3 (42), Spalte 5, Zeile 64) , mindestens einen Farbstoff (Spalte 7, Zeilen 12-14) und gegebenenfalls einen Reaktionspartner (Figur 3, (46)).

Daher ist Anspruch 23 nicht neu im Hinblick auf D2.

3.3 Zu Anspruch 24

D2 beschreibt einen Kit zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ansprüche 1 bis 16, umfassend mindestens eine Küvette nach Anspruch 18 (siehe 3.1) und/oder eine Lösung nach Anspruch 23 (siehe 3.2). Somit ist Anspruch 23 nicht neu im Hinblick auf D2.

4. Erfinderische Tätigkeit (Art.33(3) PCT)

4.1 Zu Anspruch 1

D1 das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart ein Verfahren zur Bestimmung von Substanzen, umfassend die Schritte

- Bereitstellen einer Oberfläche, welche mindestens einen Reaktionspartner R¹ (Figur 6, (522) an der Oberfläche (Figur 6, (519) gebunden umfaßt (Figur 6, Spalte 5, Zeile 18-31),
- Kontaktieren der Oberfläche mit einer Lösung, welche mindestens die zu bestimmende Substanz, mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung umfaßt (Spalte 5, Zeile 6-31), und mindestens einen Farbstoff, welcher im Absorptions- des Fluorophors absorbiert, umfaßt (Figur 6 (516)) worin sich an dem Reaktionspartner R¹ auf der Oberfläche ein Komplex ausbildet, der mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung umfaßt, und
- Anregen des auf der Oberfläche gebundenen Fluorophors durch das Evaneszenzfeld einer Lichtquelle und Messen der erzeugten Fluoreszenz (Spalte 4, line 62- column 5, Zeile 31, "complete internal reflection", "...it is known from the more advanced theory of physical optics that the radiation field of the beam", figure 6, 515),

von dem sich der Gegenstand des Anspruchs 1 dadurch unterscheidet, daß der Komplex neben dem Reaktionspartner R¹ mindestens die zu bestimmende Substanz und eine Fluorophor-haltige Verbindung umfaßt und der Farbstoff im Emissionsbereich absorbiert.

Die mit der vorliegenden Erfindung erste zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen in dem die zu bestimmende Substanz nicht durch direkte Bindung an die Oberfläche Konformations-änderungen unterworfen ist. Dem Fachmann, der auf dem Gebiet der ELISA (Enzymimmunoassay) Technologie arbeitet sind sogenannte "sandwich" Assayformate bekannt. Zudem ist in D2 im Zusammenhang mit evaneszenter Detektion ein solcher Assay (Figur 3a) beschrieben. Durch die "Sandwich"- Technologie muss die zu bestimmende Substanz nicht direkt auf der

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Oberfläche immobilisiert werden, sondern wird zum Beispiel über einen Antikörper an die Oberfläche gebunden. Der Fachmann kann dieses Verfahren direkt auf das Verfahren in D1 übertragen ohne konstruktive Änderungen an dem apparativen Aufbau vorzunehmen.

Die mit der vorliegenden Erfindung zweite zu lösende Aufgabe kann darin gesehen werden, Interferenzen mit fluoreszierenden Molekülen aus dem Umgebungsmedium (bulk) zu verringern.

Dem Fachmann ist ebenfalls aus D2 (Column 7, line 12-14) bekannt, dass durch Zugabe eines Farbstoffes, der im Absorptionsbereich des Fluorophors absorbiert, die Interferenzen mit fluoreszierenden Molekülen aus dem Umgebungsmedium (bulk) verringert werden können.

Somit ist das Verfahren durch D1 in Verbindung mit D2 nahegelegt.

4.2 Zu den abhängigen Ansprüchen

Die abhängigen Ansprüche 2-4, 6-17, 19-22, 25, 26 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in bezug erforderliche Tätigkeit erfüllen. Die Gründe dafür sind die folgenden:

- Anspruch 2-4, 8

D2 beschreibt ein Verfahren, worin die zu bestimmende Substanz als Reaktionspartner R² an den Reaktionspartner R¹ auf der Oberfläche bindet (Figur 6); der Reaktionspartner R¹ ist dabei ein Antikörper.

- Anspruch 6

D4 beschreibt ein Verfahren, worin der Reaktionspartner R¹ Streptavidin umfaßt und der Reaktionspartner R² Biotin und eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz umfaßt (Seite 309, 4.2).

- Anspruch 7

In üblichen ELISA Verfahren werden häufig Hormone, Proteine, Viren, Bakterien, Pharmazeutika oder Toxine detektiert. Der Fachmann der das Verfahren aus D1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

und D2 kennt wird die Vorteile der evaneszenten Technik nämlich Einsparung von Wasch- und Pipetierschritten nutzen und für die Detektion obiger Substanzklassen einsetzen.

- Anspruch 9, 10

D4 beschreibt ein Verfahren, worin die Fluorophor-haltige Verbindung eine fluoreszierende Verbindung und eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz aufweist (Seite 309, 4.2, fluorescein labeled streptavidin).

- Anspruch 14

D2 beschreibt eine phosphorisierte Verbindung als Fluorophor (Spalte 7, Zeile 2).

- Ansprüche 11-17

Die Verwendung von geeigneten Fluorophoren bzw. Farbstoffen stellt für den Fachmann kein erforderliches Tätig werden dar, da die beanspruchten Farbstoffe oder Fluorophore kommerziell erhältlich und deren Eigenschaften dem Fachmann bekannt sind.

- Ansprüche 19-22

Die Küvetten bzw Mikrotiterplatten die aus den beanspruchten Materialien, spezifischer Größe und Form sind dem Fachmann bekannt und kommerziell erhältlich.

Ansprüche 25 und 26

Die Verwendung des Verfahrens und damit die Nutzung der Vorteile der evaneszenten Anregung (geringere Anzahl von Wasch- und Pipetierschritten) nach einem der Ansprüche 1 bis 17 zur Bestimmung von Reaktionskinetiken immunologischer Reaktionen (Anspruch 25) oder in Diagnostik (Anspruch 26), die dem Fachmann aus der ELISA Technik bekannt sind, erfordert kein erforderliches Tätigwerden des Fachmanns, da in diesen Gebieten Bedarf zur Anwendung dieser Verfahren besteht.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

5.1 Es geht nicht klar aus Anspruch 5 hervor welches Assayformat beschrieben wird.

5.2 Die verschwommene und unpräzise Angabe in der Beschreibung auf Seite 6, (3) und (4) erweckt den Eindruck, daß der Gegenstand, für den Schutz begehr wird, nicht dem in den Ansprüchen definierten Gegenstand entspricht, und führt daher zur Unklarheit (Artikel 6 PCT), wenn die Beschreibung zur Auslegung der Ansprüche herangezogen wird (vgl. die PCT Richtlinien, III-4.3a).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Amtl. Aktenzeichen: PCT/EP00/08116

Anmelder: Stiftung für Diagnostische Forschung

"Verfahren zur Bestimmung von Substanzen mittels der Evanescenzfeldmethode"

Unser Zeichen: D 2724 - py / ml

5

Ansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Substanzen, umfassend die Schritte
 - 10 - Bereitstellen einer Oberfläche, welche mindestens einen Reaktionspartner R^1 an der Oberfläche gebunden umfaßt,
 - Kontaktieren der Oberfläche mit einer Lösung, welche mindestens die zu bestimmende Substanz, mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung und mindestens einen Farbstoff, welcher im Absorptions- und Emissions-
 - 15 Bereich des Fluorophors absorbiert, umfaßt,
 - worin sich an dem Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche ein Komplex ausbildet und worin dieser Komplex neben dem Reaktionspartner R^1 mindestens die zu bestimmenden Substanz und die mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung umfaßt, und
 - 20 - Anregen des auf der Oberfläche gebundenen Fluorophors durch das Evanescenzfeld einer Lichtquelle und Messen der erzeugten Fluoreszenz.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die zu bestimmende Substanz als Reaktionspartner R^2 an den Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche bindet.
 - 25 3. Verfahren nach Anspruch 2, worin der an der Oberfläche gebundene Reaktionspartner R^1 ein Antigen oder ein Antikörper ist.
 4. Verfahren nach Anspruch 1, worin ein Reaktionspartner R^2 die zu bestimmende Substanz umfaßt und an den Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche bindet.
 - 30 5. Verfahren nach Anspruch 1, worin eine weitere Verbindung, welche eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz aufweist und einen Reaktions-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

partner R² enthält, an den Reaktionspartner R¹ auf der Oberfläche bindet.

6. Verfahren nach Anspruch 5, worin der Reaktionspartner R¹ Avidin oder Streptavidin umfaßt und der Reaktionspartner R² Biotin und eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz umfaßt.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die zu bestimmende Substanz eine biologisch aktive Substanz umfaßt, welche aus der Gruppe Hormone, Proteine, Viren, Bakterien, Pharmazeutika und Toxine ausgewählt ist.
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die zu bestimmende Substanz ein Protein, vorzugsweise ein Antigen oder einen Antikörper, umfaßt.
- 15 9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Fluorophorhaltige Verbindung eine fluoreszierende Verbindung und eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz aufweist.
- 20 10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin als Fluorophor fluoreszierende Proteine und/oder niedermolekulare fluoreszierende chemische Verbindungen verwendet werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, worin als fluoreszierende Proteine Phycobiliproteine, wie Allophycocyanin (APC), CryptoFluor Crimson oder CryptoFluor Red, verwendet werden.
- 25 12. Verfahren nach Anspruch 11, worin als niedermolekulare fluoreszierende Verbindungen Cy5 oder BODIPY verwendet werden.
- 30 13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin mindestens ein Fluorophor verwendet wird, welcher in einem Wellenlängenbereich von 600 bis 700 nm absorbiert.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin mindestens eine phosphoreszierende Verbindung als Fluorophor verwendet wird.
- 5 15. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin eine Mischung von Farbstoffen verwendet wird, welche im Absorptions- und/oder Emissionsbereich des Fluorophors absorbieren.
- 10 16. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin mindestens ein Farbstoff verwendet wird, welcher in einem Wellenlängenbereich von 600 bis 700 nm absorbiert.
- 15 17. Verfahren nach Anspruch 16, worin als der mindestens eine Farbstoff Brillantblau FCF in einer Konzentration von mindestens 0,001 mM verwendet wird.
- 20 18. Küvette oder Mikrotiterplatte zur Verwendung in dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, welche mindestens einen Reaktionspartner für die zu bestimmende Substanz an einer Oberfläche gebunden umfaßt, wobei die Küvette einen Kunststoff umfaßt.
- 25 19. Küvette oder Mikrotiterplatte nach Anspruch 18, wobei der mindestens eine Reaktionspartner R¹ in lyophilisierter Form vorliegt.
- 30 20. Küvette oder Mikrotiterplatte nach Anspruch 18 oder 19, wobei die Küvette Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Polyacrylnitril, Polymethylmethacrylat, Polycycloolefin, Polyethylenterephthalat und/oder Mischungen derselben umfaßt.
21. Küvette oder Mikrotiterplatte nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Küvette oder Mikrotiterplatte einteilig ist.
22. Küvette nach einem der Ansprüche 18 bis 21, wobei die Küvette ein Reakti-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

onsvolumen von 1 bis 400 μ l aufweist.

23. Lösung, enthaltend mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung, mindestens einen Farbstoff und gegebenenfalls einen Reaktionspartner R² zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17.

5 24. Kit zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, umfassend mindestens eine Küvette oder Mikrotiterplatte nach einem der Ansprüche 18 bis 22, und/oder mindestens eine Lösung nach Anspruch 23.

10

25. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17, zur Bestimmung von Reaktionskinetiken immunologischer Reaktionen.

15

26. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17 in der medizinischen oder veterinärmedizinischen Diagnostik, der Lebensmittelanalytik, der Umweltanalytik oder der Analytik von Fermentationsprozessen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In re application : MANFRED SCHAWALLER, ET AL.
Application No. :
Filed : Herewith
For : METHOD FOR THE DETERMINATION OF
SUBSTANCES USING THE EVANESCENCE FIELD
METHOD
Examiner :
Attorney's Docket : MBP-009XX

ANNEX TO

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
of PCT/EP00/08116
DATED 26 November 2001

IN GERMAN LANGUAGE

CONSISTING OF: 4 PAGES OF CLAIMS 1-26

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Amtl. Aktenzeichen: PCT/EP00/08116

Anmelder: Stiftung für Diagnostische Forschung

"Verfahren zur Bestimmung von Substanzen mittels der Evanescenzfe Idmethode"

Unser Zeichen: D 2724 - py / ml

5

Ansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Substanzen, umfassend die Schritte

- Bereitstellen einer Oberfläche, welche mindestens einen Reaktionspartner R^1 an der Oberfläche gebunden umfaßt,
- Kontaktieren der Oberfläche mit einer Lösung, welche mindestens die zu bestimmende Substanz, mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung und mindestens einen Farbstoff, welcher im Absorptions- und Emissionsbereich des Fluorophors absorbiert, umfaßt,
- worin sich an dem Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche ein Komplex ausbildet und worin dieser Komplex neben dem Reaktionspartner R^1 mindestens die zu bestimmenden Substanz und die mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung umfaßt, und
- Anregen des auf der Oberfläche gebundenen Fluorophors durch das Evanescenzfeld einer Lichtquelle und Messen der erzeugten Fluoreszenz.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die zu bestimmende Substanz als Reaktionspartner R^2 an den Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche bindet.

25

3. Verfahren nach Anspruch 2, worin der an der Oberfläche gebundene Reaktionspartner R^1 ein Antigen oder ein Antikörper ist.

30

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin ein Reaktionspartner R^2 die zu bestimmende Substanz umfaßt und an den Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche bindet.

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin eine weitere Verbindung, welche eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz aufweist und einen Reaktions-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

partner R² enthält, an den Reaktionspartner R¹ auf der Oberfläche bindet.

6. Verfahren nach Anspruch 5, worin der Reaktionspartner R¹ Avidin oder Streptavidin umfaßt und der Reaktionspartner R² Biotin und eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz umfaßt.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die zu bestimmende Substanz eine biologisch aktive Substanz umfaßt, welche aus der Gruppe Hormone, Proteine, Viren, Bakterien, Pharmazeutika und Toxine ausgewählt ist.
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die zu bestimmende Substanz ein Protein, vorzugsweise ein Antigen oder einen Antikörper, umfaßt.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Fluorophorhaltige Verbindung eine fluoreszierende Verbindung und eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz aufweist.
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin als Fluorophor fluoreszierende Proteine und/oder niedermolekulare fluoreszierende chemische Verbindungen verwendet werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, worin als fluoreszierende Proteine Phycobiliproteine, wie Allophycocyanin (APC), CryptoFluor Crimson oder CryptoFluor Red, verwendet werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, worin als niedermolekulare fluoreszierende Verbindungen Cy5 oder BODIPY verwendet werden.
13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin mindestens ein Fluorophor verwendet wird, welcher in einem Wellenlängenbereich von 600 bis 700 nm absorbiert.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin mindestens eine phosphoreszierende Verbindung als Fluorophor verwendet wird.
- 5 15. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin eine Mischung von Farbstoffen verwendet wird, welche im Absorptions- und/oder Emmissionsbereich des Fluorophors absorbieren.
- 10 16. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin mindestens ein Farbstoff verwendet wird, welcher in einem Wellenlängenbereich von 600 bis 700 nm absorbiert.
- 15 17. Verfahren nach Anspruch 16, worin als der mindestens eine Farbstoff Brillantblau FCF in einer Konzentration von mindestens 0,001 mM verwendet wird.
- 20 18. Küvette oder Mikrotiterplatte zur Verwendung in dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, welche mindestens einen Reaktionspartner für die zu bestimmende Substanz an einer Oberfläche gebunden umfaßt, wobei die Küvette einen Kunststoff umfaßt.
- 25 19. Küvette oder Mikrotiterplatte nach Anspruch 18, wobei der mindestens eine Reaktionspartner R¹ in lyophilisierter Form vorliegt.
- 20 20. Küvette oder Mikrotiterplatte nach Anspruch 18 oder 19, wobei die Küvette Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Polyacrylnitril, Polymethylmethacrylat, Polycycloolefin, Polyethylenterephthalat und/oder Mischungen derselben umfaßt.
- 30 21. Küvette oder Mikrotiterplatte nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Küvette oder Mikrotiterplatte einteilig ist.
22. Küvette nach einem der Ansprüche 18 bis 21, wobei die Küvette ein Reakti-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

onsvolumen von 1 bis 400 μ l aufweist.

23. Lösung, enthaltend mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung, mindestens einen Farbstoff und gegebenenfalls einen Reaktionspartner R^2 zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17.
24. Kit zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, umfassend mindestens eine Küvette oder Mikrotiterplatte nach einem der Ansprüche 18 bis 22, und/oder mindestens eine Lösung nach Anspruch 23.
25. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17, zur Bestimmung von Reaktionskinetiken immunologischer Reaktionen.
26. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17 in der medizinischen oder veterinärmedizinischen Diagnostik, der Lebensmittelanalytik, der Umweltanalytik oder der Analytik von Fermentationsprozessen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

~~REPLACED BY
ART 3d A.M.O.T.~~

Claims

1. A method for assaying substances, comprising the following steps:
 - providing a surface that has at least one reaction partner R1 for reaction partner R2 bonded to a surface
 - placing in contact with the surface a solution that contains at least the substance being assayed, at least one compound containing a fluorophor and at least one dye that absorbs in the absorption and/or emission range of the fluorophor, wherein a complex forms on reaction partner R1 on the surface by means of reaction partner R2 and wherein this complex contains, besides reaction partner R1 at least the substance being assayed and the compound containing at least one fluorophor, and
 - exciting the fluorophor bonded to the surface by the evanescence field of a light source and measuring the fluorescence produced.
- 15 2. The method according to Claim 1, wherein the substance being assayed, as reaction partner R2, binds to reaction partner R1 on the surface.
3. The method according to Claim 2, wherein the reaction partner R1 bonded to the surface is an antigen or an antibody.
- 20 4. The method according to Claim 1, wherein another compound, which has a binding site for the substance being assayed and which contains a reaction partner R2, binds to reaction partner R1 on the surface.
- 25 5. The method according to Claim 4, wherein reaction partner R1 comprises avidin or streptavidin and reaction partner R2 comprises biotin and a binding site for the substance being assayed.
6. The method according to any one of the preceding claims, wherein the substance being assayed comprises a biologically active substance, selected from the group of hormones, proteins, viruses, bacteria, pharmaceuticals and toxins.
- 30 7. The method according to any one of the preceding claims, wherein the substance being assayed comprises a protein, preferably an antigen or an antibody.
8. The method according to any one of the preceding claims, wherein the compound containing fluorophor has a fluorescing compound and a binding site for the substance being assayed.
- 35 9. The method according to any one of the preceding claims, wherein proteins fluorescing and/or low-molecular fluorescing chemical compounds are used as the fluorophor.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10. The method according to Claim 9, wherein phycobili proteins like allophycocyanine (APC), CryptoFluor Crimson or CryptoFluor Red are used as the fluorescing proteins.
- 5 11. The method according to Claim 9, wherein Cy5 or BODIFY are used as the low-molecular fluorescing compounds.
12. The method according to any one of the preceding claims, wherein at least one fluorophor is used that absorbs in a wavelength range from 600 to 700 nm.
- 10 13. The method according to any one of the preceding claims, wherein at least one phosphorescing compound is used as the fluorophor.
14. The method according to any one of the preceding claims, wherein a mixture of dyes is used that absorb in the absorption and/or emission range of the fluorophor.
- 15 15. The method according to any one of the preceding claims, wherein at least one dye is used that absorbs in the wavelength range from 600 to 700 nm.
- 20 16. The method according to Claim 15, wherein Brilliant Blue FCF is used as the at least one dye in a concentration of at least 0.001 mM.
17. A cuvette or microtiter plate for use in the method according to any one of Claims 1 to 16, which comprises at least one reaction partner for the substance being assayed bonded on a surface.
- 25 18. The cuvettes or microtiter plates according to Claim 17, whereby at least one reaction partner R1 comes in lyophilized form.
- 30 19. The cuvettes or microtiter plates according to Claim 17 or 18, whereby the cuvette includes a plastic, preferably polystyrene, polypropylene, polyethylene, polyacrylnitrile, polymethylmethacrylate, polycycloolefin, polyethylene terephthalate and/or mixtures thereof.
- 20 35 20. The cuvettes or microtiter plates according to any one of Claims 17 to 19, whereby the cuvette or microtiter plate is integrally formed.
21. The cuvette according to any one of Claims 17 to 20, whereby the cuvette has a reaction volume from 1 to 400 µl.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

22. A solution containing at least one compound containing fluorophor, at least one dye and, if necessary, a reaction partner R2 for use in the method according to any one of Claims 1 to 16.
23. A kit for use in the method according to any one of Claims 1 to 16, including at least one of the cuvette or microtiter plates according to any one of Claims 17 to 21, and/or at least one solution according to Claim 22.
24. The use of the method according to any one of Claims 1 to 16 to determine reaction kinetics of immunologic reactions.
- 10 25. The use of the method according to any one of Claims 1 to 16 in medical or veterinary medical diagnostics, food analysis, environmental analysis or analysis of fermentation processes.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

"Verfahren zur Bestimmung von Substanzen mittels der Evanszenzfeldmethode"

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Substanzen auf Basis der Evanszenzfeldmethode und eine Küvette, eine Mikrotiterplatte, eine Lösung und ein Kit zur Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren. Die vorliegende Erfindung kann insbesondere in der Diagnostik und Analytik 5 eingesetzt werden.

Die medizinische Diagnostik, im speziellen die immunologische Diagnostik, basiert zu einem großen Teil auf dem ELISA (Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay). Eine neuere Übersicht über Immuno-Assays findet sich bei Hage, Anal. Chem. 71 10 (1999), 294R-304R. Ein ELISA-Test dient zur Bestimmung der Konzentration von Antigenen oder Antikörpern. Die zu untersuchende Substanz (z.B. ein Antigen) wird zunächst mit einem festen Träger in Kontakt gebracht, an den vorher ein spezifischer Reaktionspartner für die zu untersuchende Substanz (z.B. ein Antikörper) gekoppelt wurde. Durch die Bindung der zu untersuchenden Substanz 15 an den auf dem Träger gekoppelten Reaktionspartner wird die zu untersuchende Substanz an dem festen Träger konzentriert. Anschließend wird ein zweiter Reaktionspartner (z.B. ein weiterer Antikörper) für die zu untersuchende Substanz mit dem Träger in Kontakt gebracht, wobei dieser Reaktionspartner mit einem Enzym markiert ist, welches einen colorimetrischen Nachweis erlaubt. Durch die 20 Reaktion dieses zweiten Reaktionspartners mit der an die Oberfläche des Trägers gekoppelten, zu untersuchenden Substanz entsteht ein farbiges Produkt, welches optisch ausgewertet werden kann. Als Festphase kommen dabei meistens standardisierte Kunststoffplatten, häufig aus Polystyrol, mit 96 Vertiefungen ("Wells") zur Anwendung. Die Oberfläche der Kunststoff-Wells bindet Proteine im 25 Nanogramm-Bereich durch Adsorption, was eine für immunologische Nachweise ausreichende Menge ist. Für die Markierung des zweiten Reaktionspartners, welcher meist ein Immunoglobulin ist, mit Enzym gibt es eine Reihe von

Möglichkeiten. Gängige Markierungen sind Peroxidase oder alkalische Phosphatase.

ELISA's zeigen sehr gute Ergebnisse hinsichtlich Empfindlichkeit und Spezifität,

5 die erreichbaren Nachweisgrenzen liegen im Nanogrammbereich oder darunter. Es gibt die verschiedensten Ausführungsformen von Assays, die auf diesem Prinzip beruhen. Dabei werden je nach Fragestellung Antigene oder Antikörper nachgewiesen.

10 Ein wesentlicher Nachteil des ELISA ist jedoch die Handhabung des Tests, da nacheinander verschiedene Reagenzien zu den Wells zugegeben und wieder entfernt werden müssen. Insgesamt können zehn oder mehr Pipettier-, Wasch- und Inkubationsschritte erforderlich sein. Deshalb sind ELISA's zeit- und arbeitsaufwendig und müssen von einem speziell ausgebildeten Personal mit großer 15 Sorgfalt durchgeführt werden. Ein weiterer Nachteil des ELISA's ist die durch die Summe der Inkubations- und Waschschritte benötigte Zeitdauer für einen Assay bzw. Test, der normalerweise eine bis mehrere Stunden dauert.

20 Mittels der Evanszenzfeldmethode kann die Interaktion von beispielsweise Biomolekülen an einer Oberfläche direkt beobachtet werden. Dabei wird die Interaktion des Reaktanten in Lösung mit einer festen Matrixoberfläche gemessen. Man kann ohne Zeitverzögerung (in "real-time") die Bindung des Liganden physikalisch als Oberflächen-Plasmonen-Resonanz ("Surface Plasmon Resonance") messen. Die Vorteile gegenüber einem ELISA sind das Wegfallen 25 weiterer Pipettierschritte nach der Zugabe der Reagenzien und das Wegfallen der Warteschritte. Bisher werden jedoch für detaillierte Messungen aufwendige Apparaturen und mehrlagige Sensorchips mit spezieller Oberflächenchemie benötigt. Diese Nachteile verhindern bisher einen Einsatz der Methode in der Routinediagnostik.

30 Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Bestimmung von Substanzen, insbesondere biologisch aktiven Substanzen, bereitzustellen, bei dem die bei einem ELISA üblichen Wasch- und Pipettierschritte möglichst ganz vermieden werden können und die

Inkubationszeiten reduziert werden können. Ferner sollen leicht herstellbare und billige Sensorchips bzw. Küvetten mit denen ein derartiges Verfahren durchführbar ist, erhältlich sein.

5 Diese Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstände gelöst.

Insbesondere wird ein Verfahren zur Bestimmung von Substanzen bereitgestellt, umfassend die Schritte

10 - Bereitstellen einer Oberfläche, welche mindestens einen Reaktionspartner R^1 für einen Reaktionspartner R^2 an der Oberfläche gebunden umfaßt,

- Kontaktieren der Oberfläche mit einer Lösung, welche mindestens die zu bestimmende Substanz, mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung und mindestens einen Farbstoff, welcher im Absorptions- und/oder

15 Emissionsbereich des Fluorophors absorbiert, umfaßt, worin sich an dem Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche mittels des Reaktionspartners R^2 ein Komplex ausbildet und worin dieser Komplex neben dem Reaktionspartner R^1 mindestens die zu bestimmenden Substanz und die mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung umfaßt, und

20 - Anregen des auf der Oberfläche gebundenen Fluorophors durch das Evaneszenzfeld einer Lichtquelle und Messen der erzeugten Fluoreszenz.

Die Figuren zeigen:

25 Figur 1 ist eine schematische Darstellung einer Ausführungsform der erfindungsgemäß Küvette sowie des erfindungsgemäß Verfahrens gemäß einer Ausführungsform.

30 Figur 2 zeigt eine schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäß Verfahrens.

Figur 3 zeigt den Intensitätsverlauf von elektromagnetischer Strahlung innerhalb einer Farbstofflösung gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Figur 4 zeigt in doppelt logarithmischer Darstellung den Intensitätsverlauf in Abhängigkeit von der Eindringtiefe einer evaneszenten Welle und einer durch Absorption gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes abgeschwächten Welle.

5 Figur 5 zeigt die Absorptionsspektren einer Reihe von Farbstoffen.

Figur 6 zeigt die Bestimmung der optimalen Konzentration eines Farbstoffes zur Verwendung gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

10 Figur 7 zeigt eine mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens gemessene Reaktionskinetik der Anlagerung eines Proteins an auf der Oberfläche gebundene Reaktionspartner R¹.

15 Figur 8 zeigt eine Vergleichsmessung zur Reaktionskinetik gemäß Figur 7, welche wie bei Figur 7 gemessen wurde. Jedoch wurde bei diesem Vergleichsbeispiel die Oberfläche nicht mit einem Reaktionspartner R¹ für das Protein beschichtet.

Erfindungsgemäß wird zunächst eine Oberfläche bereitgestellt, welche mindestens einen Reaktionspartner R¹ gebunden bzw. immobilisiert umfaßt.
20 Gebunden bedeutet dabei vorzugsweise, daß der Reaktionspartner R¹ durch Adsorption an der Oberfläche anhaftet (direkte Adsorption). Der Reaktionspartner R¹ kann aber auch über ein Brückenglied, beispielsweise ein Protein, wie einen Antikörper oder ein Antigen, an die Oberfläche gebunden sein. Ferner kann der Reaktionspartner R¹ auch durch eine kovalente Bindung an die Oberfläche gebunden sein. Dies kann beispielsweise bei einer Acrylat-Oberfläche durch 25 Umsetzung mit einem Carbodiimid bewirkt werden. „Gebunden“ bedeutet im Sinne der Erfindung das Anhaften eines Reaktionspartners bzw. einer Verbindung an einer Oberfläche bzw. an einem weiteren Reaktionspartner und/oder Verbindung und umfaßt sowohl kovalente als auch nicht-kovalente 30 Wechselwirkungen, wie beispielsweise Wechselwirkungen aufgrund ionischer, polarer oder unpolarer Wechselwirkungen.

Der Reaktionspartner R¹ kann durch übliche Verfahren auf die Oberfläche aufgebracht werden. Beispielsweise kann ein als Reaktionspartner R¹ dienendes Protein auf die Oberfläche beschichtet werden (Coaten). Der Reaktionspartner R¹

kann vorzugsweise adsorptiv oder durch kovalente Bindung an die Oberfläche gebunden sein. Im Anschluß an diesen Arbeitsgang wird die Oberfläche vorzugsweise mit einer weiteren Lösung behandelt, durch welche nicht mit dem Reaktionspartner R^1 behaftete Stellen der Oberfläche blockiert bzw. geblockt werden, beispielsweise durch ein weiteres Protein, welches im wesentlichen nicht mit den in der zu kontaktierenden Lösung enthaltenen Komponenten reagiert. Die vorstehende Oberfläche ist beispielsweise eine Innenseite eines konkaven Behälters, wie eine Küvette oder eine Vertiefung (Well) einer Mikrotiterplatte.

10 Erfindungsgemäß kann der an der Oberfläche gebundene Reaktionspartner R^1 mittels eines Reaktionspartners R^2 auf der Oberfläche einen Komplex ausbilden, wobei dieser Komplex neben dem Reaktionspartner R^1 mindestens die zu bestimmende Substanz und die mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung umfaßt. Durch den an der Oberfläche gebundenen Reaktionspartner R^1 wird der
15 Komplex mit der zu bestimmende Substanz an der Oberfläche „verankert“, d.h. fixiert und kann gleichzeitig durch die Markierung mit der Fluorophor-haltigen Verbindung detektiert werden.

Erfindungsgemäß wird unter einem „Komplex“ oder „Konjugat“ eine molekulare
20 Verknüpfung bzw. Aneinanderbindung zweier oder mehrerer vorzugsweise chemischer oder biochemischer Substanzen verstanden. Die Ausbildung des Komplexes erfolgt vorzugsweise mittels selektiven und/oder spezifischen Umsetzungen, besonders bevorzugt durch Antigen-Antikörper-Reaktionen. Erfindungsgemäß umfaßt der Begriff „Umsetzung“ sowohl kovalente als auch
25 nicht-kovalente Interaktionen zweier oder mehrerer Reaktionspartner, wobei innerhalb eines Komplexes oder Konjugats auch beide Arten der Wechselwirkung nebeneinander vorliegen können. Nicht-kovalente Interaktion kann beispielsweise Van-der-Waals-Wechselwirkung, polare und/oder ionische Wechselwirkung der Reaktionspartner bedeuten. Der Begriff „Reaktionspartner“ bedeutet in der vorliegenden Erfindung eine Verbindung mit einer Affinität zu einer anderen Substanz.

Erfindungsgemäß umfaßt der Komplex neben dem Reaktionspartner R^1 mindestens die zu bestimmende Substanz und die mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung.

Zur Bindung dieses Komplexes an den Reaktionspartner R^1 mittels des Reaktionspartners R^2 gibt es u.a. folgende Möglichkeiten:

- (1) Die zu bestimmende Substanz selbst ist der Reaktionspartner R^2 .
- 5 (2) Die zu bestimmende Substanz umfaßt den Reaktionspartner R^2 , d.h. der Reaktionspartner R^2 ist eine Teilstruktur der zu bestimmenden Substanz.
- (3) Die zu bestimmende Substanz weist eine Affinität bzw. Bindungsstelle für 10 den Reaktionspartner R^2 auf. Nach der Bindung des Reaktionspartners R^2 an die zu bestimmende Substanz kann sich somit Fall (2) ergeben.
- 15 (4) Eine weitere Verbindung umfaßt den Reaktionspartner R^2 oder weist eine Affinität zu dem Reaktionspartner R^2 auf, wobei diese weitere Verbindung ferner mindestens eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz umfaßt. In diesem Fall können die weitere Verbindung, die zu bestimmende Substanz und der Reaktionspartner R^2 als Konjugat bzw. Komplex (aller oder nur einzelner) in die Lösung gegeben werden oder das Konjugat bildet sich in der Lösung.

Im folgenden wird auf bevorzugte Ausführungsformen dieser Fälle (1) bis (4) im einzelnen eingegangen.

20 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäß Verfahrens kann die zu bestimmende Substanz selbst eine Affinität zu dem Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche aufweisen und kann daher direkt mit diesem Reaktionspartner R^1 eine Bindung eingehen. Gemäß dieser Ausführungsform 25 kann die zu bestimmende Substanz als Reaktionspartner R^2 an den Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche binden. Wenn es sich beispielsweise bei der zu bestimmenden Substanz um einen Antikörper handelt, kann auf der Oberfläche ein für diesen Antikörper spezifisches Antigen aufgebracht sein, oder umgekehrt.

30 Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung einer Ausführungsform der erfindungsgemäß Küvette, sowie des erfindungsgemäß Verfahrens gemäß der vorstehenden Ausführungsform. Die Küvette 1 weist eine Vertiefung 2 auf, deren Oberfläche 3 Reaktionspartner R^1 4 für das zu bestimmende Protein gebunden umfaßt. Die Vertiefung 2 nimmt ferner die mit der Oberfläche 3 zu

kontaktierende Lösung 5 auf, welche gemäß dieser Ausführungsform einen Farbstoff 6 und die bereits als Konjugat mit der Fluorophor-haltigen Verbindung vorliegende, zu bestimmende Substanz 7 umfaßt. Die zu bestimmende Substanz reagiert mit dem auf der Oberfläche gebundenen Reaktionspartner R¹ 4 zu einem 5 Komplex 9 auf der Oberfläche 3. Beispielsweise mit einer Laserdiode 12 wird ein Lichtstrahl 10 auf die Unterseite der Oberfläche 3 projiziert, welcher an der Phasengrenzfläche 11 total reflektiert wird. Dadurch bildet sich über der Oberfläche 3 ein Evaneszenzfeld 13 aus, in dem sich im wesentlichen nur an die 10 Oberfläche im Komplex 9 gebundenes Fluorophor befindet. Im Gegensatz zur schematischen Darstellung in Figur 1 erstreckt sich das Evaneszenzfeld üblicherweise nicht über die gesamte Breite des Küvettenbodens. Beispielsweise kann das Evaneszenzfeld eine Ausdehnung von etwa 1 mm² aufweisen. Durch die Anregung der Fluorophore durch das Evaneszenzfeld 13 emittieren die auf der Oberfläche gebundenen Fluorophore Photonen 14, welche beispielsweise mittels 15 eines Photomultipliers 15 verstärkt und gemessen werden können. Die Fluoreszenz des Volumens 16 wird im wesentlichen durch die Anwesenheit des Farbstoffs 6 unterdrückt.

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform weist die zu bestimmende 20 Substanz selbst (im wesentlichen) keine oder nur geringe Affinität zu dem Reaktionspartner R¹ auf der Oberfläche auf. In diesem Fall enthält beispielsweise die mit der Oberfläche in Kontakt zu bringende Lösung eine weitere Verbindung, welche einen Reaktionspartner R² und eine Bindungsstelle zu der zu bestimmenden Substanz umfaßt. Der Reaktionspartner R² kann an den 25 Reaktionspartner R¹ auf der Oberfläche binden und fixiert die zu bestimmende Substanz so indirekt an der Oberfläche. Diese weitere Verbindung dient somit als Brückenglied zwischen der zu bestimmenden Substanz und dem Reaktionspartner R¹ auf der Oberfläche. Beispielsweise kann als Reaktionspartner R¹ auf der Oberfläche Avidin vorliegen. Die weitere Verbindung umfaßt 30 dann neben einer Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz beispielsweise Biotin, welches an das auf der Oberfläche gebundene Avidin binden kann. Diese Ausführungform hat beispielsweise den Vorteil, daß eine mit Avidin beschichtete Oberfläche im Gegensatz zu manchen Antikörpern und Antigenen lyophilisiert werden kann und getrocknet oder lyophilisiert sehr stabil ist. Außerdem weist das

System Avidin/Biotin eine sehr hohe Dissoziationskonstante K_D auf. Weiterhin ist es so möglich, für eine Reihe von verschiedenen Bestimmungen immer eine Avidin-beschichtete Oberfläche vorzulegen und nur die weitere Verbindung, welche mit der Lösung mit der Oberfläche in Kontakt gebracht wird, auf die zu bestimrende Substanz abzustimmen.

Figur 2 zeigt schematisch diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. In der mit der Oberfläche in Kontakt gebrachten Lösung liegen nebeneinander die zu bestimmende Substanz 20, ein Farbstoff 22, eine Fluorophor-haltige Verbindung 24 und eine weitere Verbindung 26 vor. Auf der Oberfläche ist der Reaktionspartner R^1 28 gebunden. Die weitere Verbindung und die Fluorophor-haltige Verbindung lagern sich an die zu bestimmende Substanz an (Konjugat 30), und es erfolgt eine Bindung des Konjugats 30 über den in der weiteren Verbindung 26 vorliegenden Reaktionspartner R^2 an den auf der Oberfläche vorliegenden Reaktionspartner R^1 28 zu dem Komplex 32. So wird der Komplex 32, welcher die Fluorophor-haltige Verbindung 24 enthält, an die Oberfläche gebunden und kann durch Messung der Fluoreszenz im Evaneszenzfeld 34 bestimmt werden.

Für diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens eignen sich beispielsweise neben dem System Avidin(oder Streptavidin)/Biotin alle Liganden bzw. Liganden-bindende Systeme, in welchen beispielsweise Proteine selektive und/oder spezifische Bindungsstellen für einen oder mehrere Liganden, wie beispielsweise Histidin, Histidintags, Lectine, und/oder Digoxigenin, aufweisen, und natürlich Antigen/Antikörper-Systeme.

Die mit der Oberfläche zu kontaktierende Lösung enthält erfindungsgemäß weiterhin mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung. Erfindungsgemäß wird unter einem Fluorophor eine fluoreszierende Verbindung, wie ein Fluoreszenzfarbstoff, verstanden. Bevorzugt sind fluoreszierende Proteine und/oder niedermolekulare fluoreszierende chemische Verbindungen. Als fluoreszierende Proteine können erfindungsgemäß Phycobiliproteine, wie Allophycocyanin (APC), Cryptofluor Crimson oder Cryptofluor Red, verwendet werden. Als niedermolekulare fluoreszierende Verbindungen können beispiels-

weise Cy5 oder BCA₂PY (4,4-Diluor-4-bora-3a,4a-diaza-1,3-dindazen-Fluorophore) genannt werden. Bevorzugt sind Fluoreszenzfarbstoffe mit einer Absorption im Bereich von 600 bis 700 nm.

5 Weiterhin kann anstelle eines Fluorophors eine Fluorophorvorläuferverbindung verwendet werden, aus welcher vor dem Meßvorgang, beispielsweise durch Änderung des pH-Werts oder durch Abspalten einer Schutzgruppe, das Fluorophor freigesetzt wird.

10 Erfindungsgemäß umfaßt der Begriff Fluorophor auch phosphoreszierende Verbindungen. Wird eine solche phosphoreszierende Verbindung als Fluorophor verwendet, so wird die ausgestrahlte Phosphoreszenz bestimmt, welche zeitlich verschoben zur Anregung stattfindet. Somit ist es möglich, den Zeitraum des Einstrahlens von dem Zeitraum des Messens zeitlich zu trennen.

15 Weiterhin weist diese Fluorophor-haltige Verbindung eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz auf. Beispielsweise kann das Fluorophor an einen Antikörper gebunden vorliegen. Dieser Fluorophor-haltige Antikörper kann vorzugsweise in einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit der zu bestimmenden

20 Substanz, beispielsweise einem Protein, als Antigen reagieren.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform liegt die zu bestimmende Substanz selbst als Fluorophor-haltige Verbindung vor. Gemäß dieser Ausführungsform können Kompetitions-Assays durchgeführt werden, welche sich insbesondere durch eine

25 geringe Nachweisgrenze auszeichnen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können die verschiedensten Substanzen nachgewiesen werden. Insbesondere eignet sich das Verfahren zur Bestimmung biologisch aktiver Substanzen, wie Hormonen, Proteinen wie Antigenen, Antikörpern oder Haptenen, Pharmazeutika, Viren, Bakterien usw.. Das Verfahren kann aber auch zum Nachweis von Umweltgiften, Toxinen, usw., dienen.

Besonders bevorzugt werden die zu bestimmenden Substanzen durch immunologische Reaktionen nachgewiesen.

Erfindungsgemäß bildet sich ein Komplex aus mindestens dem ersten Reaktionspartner R¹, der zu bestimmenden Substanz und der Fluorophor-haltigen Verbindung auf der Oberfläche aus. Es ist dann möglich, das an die Oberfläche gebundene Fluorophor durch das Evaneszenzfeld einer Lichtquelle anzuregen und die Fluoreszenz des Fluorophors zu messen.

Bei der Anregung des auf der Oberfläche gebundenen Fluorophors durch ein Evaneszenzfeld wird ein Lichtstrahl in einem derartigen Winkel auf die Unterseite der Oberfläche gerichtet, daß an der Phasengrenzfläche Küvette/Lösung Totalreflektion auftritt. Dadurch bildet sich ein Evaneszenzfeld oberhalb der Oberfläche in der Lösung aus, welches bis zu mehrere hundert Nanometer in die Flüssigkeit eindringen kann. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein Einfallsinkel von mindestens 60° bis 90° bevorzugt, so daß sich ein Evaneszenzfeld in einer Höhe bis zu 400 nm, vorzugsweise 200 nm, besonders bevorzugt 50 bis 150 nm, über der Oberfläche ausbildet. Innerhalb dieses Evaneszenzfelds vermag das eingestrahlte Licht geeignete Fluorophore anzuregen. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird beispielsweise mit einem Photomultiplier verstärkt und ausgewertet.

Da nur das an die Oberfläche gebundene Fluorophor im Evaneszenzfeld liegt, wird nur dieses gebundene Fluorophor optimal angeregt und emittiert Photonen. Nicht gebundene Fluorophor-haltige Verbindung in der Lösung befindet sich nicht im Bereich des Evaneszenzfelds, wird deshalb im wesentlichen nicht angeregt und emittiert im wesentlichen auch keine Photonen. Diese Anordnung erlaubt somit die quantitative Bestimmung von an die Oberfläche gebundenem Fluorophor in Anwesenheit von Fluorophor in der überstehenden Lösung ohne einen vorhergehenden Separations- und/oder Waschschnitt.

Als Lichtquelle kann monochromatisches Licht verwendet werden. Dabei sollte Licht einer Wellenlänge verwendet werden, welche vorzugsweise nicht mit der Emission des Fluorophors interferiert und welche sich vorzugsweise mit der Absorptionsbande des Farbstoffs überschneidet. Als Lichtquelle ist ein Laser besonders bevorzugt, insbesondere Laser, welche Licht einer Wellenlänge von

mindestens 635 nm emittieren. Insbesondere, wenn es sich bei der zu untersuchenden Lösung um Serum handelt, sind Wellenlängen von 600 bis 700 nm bevorzugt, da die Eigenfluoreszenz von Serum bei etwa 580 nm liegt.

5 Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Zunahme des an die Oberfläche gebundenen Fluorophors mit zeitlich fortschreitender Reaktion direkt gemessen werden (in real-time). Da die Menge des an die Oberfläche gebundenen Fluorophors direkt proportional zur ursprünglich vorhandenen Menge Fluorophor-haltiger Verbindung ist, erlaubt das 10 erfindungsgemäße Verfahren die quantitative Bestimmung von in der Lösung befindlichen Reaktanden in Echtzeit ohne zusätzliche weitere Wasch- und/oder Pipettierschritte.

Da die Absorptionskoeffizienten und die Emissionseigenschaften für Fluorophore 15 sehr günstig sind, ergeben sich geringe Nachweisgrenzen. Bereits nach einigen Minuten kann man Reaktionen qualitativ und/oder quantitativ auswerten.

Probleme bereitet jedoch die nicht ideale Streuung des Lichtstrahls in der Küvette, selbst wenn physikalische Maßnahmen zur Reduktion des Streulichts vor- 20 genommen werden. Durch Streuung gelangt Licht auch in das Volumen der Küvette und verursacht dort eine Hintergrundfluoreszenz. Unter "Volumen" wird erfindungsgemäß die sich außerhalb des Evaneszenzfelds befindende Flüssigkeit verstanden, welche nicht-gebundene Fluorophor-haltige Verbindungen enthält. Ferner kann sowohl in Kunststoff- wie auch von Glasküvetten die Polarisation des 25 Lichtstrahls gedreht werden. Dies führt insbesondere zu Reflektionen des Anregungslichts bei der Auskopplung. Es entsteht sog. vagabundierendes Licht, das gemeinsam mit Volumen- und Oberflächenstreuereffekten zu einer Volumen- anregung führen kann.

30 Erfindungsgemäß kann eine Anregung des sich im Volumen befindenden Fluorophors unterbunden werden, wenn der mit der Oberfläche zu kontaktierenden Lösung mindestens ein Farbstoff zugegeben wird, welcher eine Absorption im Absorptions- und/oder Emissionsbereich des Fluorophors aufweist.

Ein Vergleich der Eindringtiefen von evaneszenter Welle und von vagabundierendem Licht zeigt, daß die Unterdrückung der Volumenanregung durch Zugeben eines Farbstoffs gelingt. Physikalisch wird die Lichtabsorption durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben, wobei die Intensität des Lichts logarithmisch mit 5 der Entfernung durch Absorption abnimmt:

$$I[x] = I_0 \text{Exp}(-\alpha c x)$$

wobei I_0 die Intensität des in das absorbierende Medium einfallenden Lichts, I die 10 Intensität des aus dem absorbierenden Medium austretenden Lichts, x die Dicke des absorbierenden Mediums (Schichtdicke), α der Absorptionskoeffizient und c die Konzentration eines sich Lösung befindenden Farbstoffes sind. Figur 3 zeigt 15 den Intensitätsverlauf einer Lösung eines Absorberfarbstoffs mit zunehmender Schichtdicke, wobei der Verlauf der Intensität für $\alpha = 100.000 \text{ Mol}/(\text{L} \times \text{cm})$ und $c = 20 \text{ mMol}$ bis zu einer Tiefe von 1 mm dargestellt ist. Es ist zu erkennen, daß auf 20 dieser Strecke das Streulicht auf 1/100 seiner Anfangsintensität abgeschwächt wird. Da das Streulicht überwiegend seitlich eingekoppelt wird, genügt diese Abschwächung, um das Volumensignal und damit auch die Meßunsicherheit für das zeitabhängige Signal der Reaktionskinetik, dem dieses Signal überlagert ist, in praktisch nutzbaren Grenzen zu halten.

Figur 4 zeigt einen Vergleich der Eindringtiefen der evaneszenten Welle mit der Eindringtiefe des Lichts bei Absorption durch einen Farbstoff. Die doppelt logarithmische Darstellung zeigt den Intensitätsverlauf in Abhängigkeit von der 25 Eindringtiefe einer evaneszenten Welle (links) und einer durch Absorption abgeschwächten Welle (rechts). Die Ordinate liegt im Bereich von -2 bis 0, d.h. von 1/100 bis 1 log10 Intensität. Die dabei zugrunde gelegten Parameter entsprechen 30 technisch realisierbaren Werten. Obwohl die Dämpfung des vagabundierenden Lichts wesentlich größere Eindringtiefen als das Licht der evaneszenten Welle zuläßt, kann eine Volumenanregung und/oder -emission trotzdem effizient und im wesentlichen quantitativ unterdrückt werden, wie in den Beispielen gezeigt werden wird.

Ausschlaggebend für die Wirksamkeit der Unterdrückung ist der geometrische

Abstand zwischen demjenigen Oberflächenteil der Küvette, an dem Licht auf den Detektor gelangen kann, und den Eindringorten des vagabundierenden Lichts in das Volumen.

- 5 Wie aus Figur 4 deutlich wird, genügt für eine Streulichtabschwächung von zwei Größenordnungen ein Abstand im Bereich von einem Millimeter. Dieser Abstand kann durch eine entsprechende Küvettendimensionierung einfach eingehalten werden.
- 10 Die Absorption des dem Volumen zugegebenen Farbstoffs ist erfindungsgemäß auf den Absorptions- und/oder Emissionsbereich des Fluorophors abgestimmt. Es kann ein einzelner Farbstoff oder auch eine Mischung von Farbstoffen verwendet werden. Der Absorptionsbereich des Fluorophors wird in der Regel mit der Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle korrelieren. Dabei ist es nicht notwendig, daß der Farbstoff ein Absorptionsmaximum in diesem Spektralbereich aufweist, es kann bereits eine Schulter im Absorptionsspektrum ausreichen. Werden beispielsweise Fluorophore wie APC oder Cy5 verwendet, kann der verwendete Farbstoff eine Absorption zwischen 600 nm und 700 nm aufweisen, wie beispielsweise Brilliantblau (Brilliant-Blue FCF). Die Konzentration des zugegebenen Farbstoffs ist abhängig vom Absorptionskoeffizienten des jeweiligen Farbstoffs in Lösung und hängt zusätzlich von der Frequenz des eingestrahlten Lichts ab. Die Konzentration des Farbstoffs kann je nach Farbstoff so eingestellt werden, daß das eindringende Licht innerhalb von 1 mm oberhalb der Oberfläche im wesentlichen absorbiert werden kann. Zur Bestimmung der jeweils optimalen Konzentration des Farbstoffs werden zunächst die Volumenfluoreszenz und die Fluoreszenz im Evaneszenzfeld, d.h. die Oberflächenfluoreszenz, jeweils bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen gemessen (vgl. Figur 6a). Anschließend wird das Verhältnis von Oberflächenfluoreszenz zur Volumenfluoreszenz gegen die Konzentration des Farbstoffs aufgetragen (vgl. Figur 6b). Das Maximum der Kurve 6b stellt die optimale Konzentration des Farbstoffes dar. Erfindungsgemäß wird unter dem „Signal/Rausch-Verhältnis“ das Verhältnis der Oberflächenfluoreszenz („Signal“) zur Volumenfluoreszenz („Rauschen“) verstanden. „Im wesentlichen absorbiert“ kann dabei eine Intensitätslösung von 70 %, vorzugsweise 80 %, besonders bevorzugt von mindestens 90 %, bedeuten.

Beispielsweise kann bei Verwendung von Brilliantblau FCF als Farbstoff eine Konzentration von 0,04 mM ausreichen, um weit mehr als 95% der Volumenfluoreszenz zu löschen (vgl. Tabelle 4, Beispiel 4). Da die erforderliche Konzentration des Farbstoffs u.a. auch von der verwendeten Küvette, der 5 Meßanordnung usw. abhängt, können auch noch geringere Farbstoffkonzentrationen für ein ausreichendes Signal/Rausch-Verhältnis genügen. Demgemäß beträgt beispielsweise die Konzentration von Brilliantblau FCF vorzugsweise mindestens 0,001 mM.

10 Vergleichsversuche, wie in Figur 6a und 6b dargestellt, haben gezeigt, daß das Signal/Rausch-Verhältnis von 1,3 : 1 auf bis zu 18,5 : 1 bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verbessert werden konnte.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine Küvette bzw. eine Mikrotiterplatte zur 15 Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Küvette umfaßt vorzugsweise Glas oder einen Kunststoff, besonders bevorzugt einen Kunststoff, wie Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Polyethylenterephthalat, Polycycloolefin, Polyacrylnitril, Polymethylmethacrylat und/oder Mischungen oder Blends dieser Kunststoffe. Es ist prinzipiell jeder Kunststoff geeignet, welcher im wesentlichen 20 kein Licht im sichtbaren Bereich absorbiert. Gemäß einer Ausführungsform kann der Kunststoff auch beispielsweise leicht bläulich eingefärbt sein, um eine durch Streulicht verursachte Emission herauszufiltern. Kunststoffküvetten können kostengünstig durch Spritzgießen erhalten werden und weisen vorzugsweise ein Reaktionsvolumen von 1 bis 400 µl, besonders bevorzugt 5 bis 200 µl, auf. 25 Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen Küvetten oder Mikrotiterplatten einstückig ausgebildet. Es kann sich weiterhin als vorteilhaft ausweisen, wenn die Innenseite und/oder die Emissionsfläche, d.h. die Fläche aus der der emittierte Strahl aus der Küvette austritt, auf eine Oberflächenrauhigkeit von vorzugsweise höchstens 10 nm poliert ist/sind.

30 Die kleine Dimension und der niedrige Preis machen einen Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens in der Routinediagnostik und -analytik realisierbar. In der praktischen Anwendung kann eine derartige Küvette oder Mikrotiterplatte bereits vorpräpariert und durch ein Spezialetiket verschlossen im

Handel vertrieben werden. Die Vorpräparation umfaßt dabei das Beschichten der Oberfläche der Küvette oder Mikrotiterplatte mit dem ersten Reaktionspartner und gegebenenfalls das anschließende Blocken der nichtbeschichteten Stellen. Besonders bevorzugt liegt die beschichtete Küvette oder Mikrotiterplatte

- 5 lyophilisiert oder getrocknet vor. Es können/kann auch bereits der mindestens eine Farbstoff und/oder die mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung und/oder die weitere Verbindung in der abgeschlossenen Küvette oder Mikrotiterplatte lyophilisiert und/oder getrocknet vorliegen, so daß zur Messung nur noch die zu untersuchende Substanz in Lösung zugegeben werden muß. Durch
- 10 Versehen der Küvette oder Mikrotiterplatte mit einer Seriennummer kann jederzeit eine eindeutige Zuordnung der Erstellungscharge, der Nachweisreaktion und der Probe möglich sein.

Des weiteren umfaßt die vorliegende Erfindung eine Lösung, welche mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung und/oder mindestens einen Farbstoff, welcher im Absorptions- und/oder Emissionsbereich des Fluorophors absorbiert, umfaßt. Weiterhin kann die erfindungsgemäße Lösung gegebenenfalls eine weitere Verbindung enthalten, welche mindestens eine Bindungsstelle zu der zu bestimmenden Substanz aufweist und welche den Reaktionspartner R^2 umfaßt.

- 20 Ferner umfaßt die vorliegende Erfindung ein Kit, welches eine wie vorstehend beschriebene vorpräparierte Küvette oder Mikrotiterplatte und/oder Lösungen des mindestens einen Farbstoffs und der mindestens einen Fluorophor-haltigen Verbindung und gegebenenfalls der weiteren Verbindung, welche mindestens eine Bindungsstelle zu der zu bestimmenden Substanz aufweist und welche den Reaktionspartner R^2 umfaßt, enthalten kann. Der mindestens eine Farbstoff und die mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung können zusammen in einer Lösung, sowie in zwei getrennten Lösungen vorliegen.
- 25

- 30 Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Reaktionskinetiken vorzugsweise immunologischer Reaktionen, sowie die Verwendung des Verfahrens in der medizinischen oder veterinärmedizinischen Diagnostik, der Lebensmittelanalytik, der Umweltanalytik oder der Analytik von Fermentationsprozessen.

Als Beispiele für konkrete Anwendungen können der Nachweis von Pflanzenschutzmitteln, wie Atrazin, in Trinkwasser, der Nachweis von Hormonen in Kalbfleisch, der Nachweis von Hormonen, wie HCG, sowie der direkte oder 5 indirekte Nachweis von Viren, wie Hepatitis S und HIV, genannt werden.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden durch Beispiele weiter erläutert.

10 **Beispiel 1**

In diesem Beispiel wird der Einfluß der Konzentration des zugegebenen, an ein Protein gebundenen Fluorophors bestimmt. Bei dieser Messung ist nur an der Oberfläche gebundenes Fluorophor vorhanden, nichtgebundenes Fluorophor 15 wurde weggewaschen. Ein Farbstoff wurde der Lösung nicht zugesetzt.

a) Beschichten einer Oberfläche einer Küvette mit CACMAK

Die Oberfläche einer Küvette wurde beschichtet, indem 200 µl Mouse IgG1, 20 monoklonaler Antikörper Ac1-20.4-2. (CACMAK; Fa. Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany) 5 µg/ml in PBS+ (PBS+ = 100 mM PO₄, pH 7,5; 100 mM NaCl) bei Raumtemperatur (RT) über Nacht (ON) auf der Oberfläche belassen wurde. Dann wurde die Oberfläche viermal mit PBS (phosphate buffered saline) gewaschen und mit 1% BSA (Bovine Serum Albumine) Miles Enhanced, PBS+, 25 300 µl, für eine Stunde bei RT behandelt.

b) Kontaktieren der Oberfläche mit dem zu bestimmenden Protein

GAMAPC (Konjugat aus Allophycocyanin (APC) und Crosslinked, Goat Anti-30 Mouse IgG (H+L); Molecular Probes, Leiden, Netherlands) in PBS+T (PBS+T = 100 mM PO₄, pH 7,5; 100 mM NaCl, 0,025v/v Tween20) wurde über Nacht bei RT auf der Oberfläche belassen. Anschließend wurde fünfmal mit PBS gewaschen, und es wurden 200µl PBS+T zugegeben und die Fluoreszenz mittels der Evanszenzfeldmethode gemessen. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Konzentration der Beschichtungslösung des Antigens CACMAK [μ g/ μ l]	Konzentration GAMAPC [μ g/ μ l]	Emmission [Photonencounts/s]
0	10	3.000
5	10	120.000
5	3	60.000
5	1	18.000
5	0	3.000

Es wurde demnach eine von der Konzentration des auf der Oberfläche gebundenen Fluorophors APC abhängige Emission von Photonen festgestellt.

5

Beispiel 2

Endpunktreaktion mit Waschen des Chips und Messen der Fluoreszenz. Es ist nur gebundenes Fluorophor bei der Messung vorhanden.

10

a) Beschichten einer Oberfläche einer Küvette

Die Oberfläche von Küvennetten wurde beschichtet, indem 200 μ l Humanserum 1:1000 in PBS+ bei Raumtemperatur (RT) über Nacht auf der Oberfläche belassen wurden. Dann wurde die Oberfläche viermal mit PBS gewaschen und mit 1% BSA (Bovine Serum Albumine) Miles enhanced, PBS+, 300 μ l, für eine Stunde bei RT behandelt.

20

Anti-Human-IgG-Cy5-Konjugat (amersham pharmacia biotech, Dübendorf, Schweiz) in PBS+T wurde über Nacht bei RT auf der Oberfläche belassen. Anschließend wurde fünfmal mit PBS gewaschen, und es wurden 200 μ l PBS+T zugegeben und die Fluoreszenz gemessen. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 gezeigt.

25

Tabelle 2

Beschichtetes Humanserum-Antigen	Anti-Human-IgG-Cy5- Konjugat	Emission [Photonencounts/s]
0	1:100	3.000
1:1000	1:100	7.000
1:1000	1:300	6.000
1:1000	1:1000	5.000
1:1000	0	3.000

Wiederum konnte eine von der Konzentration des gebundenen Fluorophors Cy5 abhängige Emission von Photonen gemessen werden.

5

Beispiel 3

In diesem Beispiel wurde die Wirksamkeit verschiedener Farbstoffe zur Vermin-
10 derung der Volumenabsorption untersucht. Die Oberfläche der Küvette war in
diesem Beispiel nicht beschichtet, es wurde nur die Reduzierung der Fluoreszenz
des in Lösung befindlichen Konjugats aus Protein und Fluorophor bestimmt. Die
Fluorophore im Volumen der Reaktionslösung werden durch die geringen Mengen
Streulicht angeregt und fluoreszieren. Die Absorptionsspektren der verwendeten
15 Farbstoffe sind in Fig. 5 gezeigt.

GAMAPC 10 μ g/ml in PBS+T wird mit verschiedenen Farbstoffen gemischt und
die Fluoreszenz durch die Volumenanregung gemessen. Das Ergebnis ist in
Tabelle 3 gezeigt.

20

Tabelle 3

Zugegebener Farbstoff	Absorption des Farbstoffs bei 650 nm	Emission des Fluorophors [Fluoreszenzcounts/s]
Küvette ohne Fluorophor	---	3.300
Kein Absorberfarbstoff	0,00	210.000
Brilliant-Blue FCF ¹⁾ 0,25 mM	0,55 0,05	4.200 120.000
Amaranth ²⁾ 1 mM	0,30	4.400
5% Supercook Blue ³⁾	0,10	23.000
5% Supercook Green ³⁾	<0,04	190.000
5% Supercook Egg Yellow ³⁾	<0,04	200.000
5% Supercook Pink ³⁾	0,05	99.000
5% Supercook Cochineal ³⁾		

Anmerkungen:

¹⁾ Brilliant-Blue FCF (Erioglaucine A), Fluka, Buchs, CH

²⁾ Amaranth, Fluka, Buchs, CH

³⁾ Supercook Food Colourings, Supercook, Leeds, GB

Es wurde somit festgestellt, daß bei der Verwendung von APC als Fluorophor Farbstoffe oder Mischungen davon, die zwischen 600 und 700 nm absorbieren, die Volumenfluoreszenz durch Absorption des einfallenden und/oder emittierten Lichts reduzieren.

Beispiel 4

15

In diesem Beispiel wird die Abhängigkeit der Reduzierung der Volumenfluoreszenz von der Konzentration des Farbstoffs Brillantblau FCF (Brilliant-Blue FCF) bei Verwendung von APC als Fluorophor untersucht.

a) Vorbereitung der Küvette

Die Küvette wird mit 1 % BSA Miles enhanced, in PBS+ 300 µl, eine Stunde bei RT blockiert.

5

b) Kontaktieren mit der das Fluorophor und den Farbstoff enthaltenden Lösung

GAMAPC (10 µg/ml) in PBS+T wird mit Brilliantblau FCF in verschiedenen Konzentrationen gemischt und die Fluoreszenz der Volumenanregung gemessen.

10 Tabelle 4

Zugegebene Farbe in PBS+T	Konzentration des Farbstoffs [mM]	Emission des Fluorophors [Fluoreszenzcounts/s]
keine (nur Küvette)	—	3.300
keine (Küvette + GAMAPC)	—	106.000
GAMAPC + Brilliant-Blue FCF ⁴⁾	0,02	26.000
GAMAPC + Brilliant-Blue FCF ⁴⁾	0,04	9.000
GAMAPC + Brilliant-Blue FCF ⁴⁾	0,08	4.000
GAMAPC + Brilliant-Blue FCF ⁴⁾	0,16	4.000
GAMAPC + Brilliant-Blue FCF ⁴⁾	0,32	4.000
GAMAPC + Brilliant-Blue FCF ⁴⁾	0,63	4.000
GAMAPC + Brilliant-Blue FCF ⁴⁾	1,25	4.000
GAMAPC + Brilliant-Blue FCF ⁴⁾	2,50	4.000
GAMAPC + Brilliant-Blue FCF ⁴⁾	5,0	4.000
GAMAPC + Brilliant-Blue FCF ⁴⁾	10,0	4.000

Anmerkung: ⁴⁾ Brilliant-Blue FCF (Erioglaucine A), Fluka, Buchs, CH

15 Die Reduktion der Volumenanregung ist abhängig von der Konzentration des Farbstoffs Brilliantblau im Volumen. Bei Brilliantblau FCF sind bereits bei einer Konzentrationen von 0,04 mm und darüber weit mehr als 95% der Volumenfluoreszenz gelöscht.

Beispiel 5

In diesem Beispiel wird der Einfluß des Farbstoffs auf die Fluoreszenz der an der Oberfläche gebundenen Fluorophore untersucht. Endpunktreaktion mit Waschen
5 der Oberfläche und Messen der Fluoreszenz. Es ist nur gebundenes Fluorophor bei der Messung vorhanden.

Eine wie in Beispiel 1a) preparede Küvette wird mit GAMAPC in PBS+T über Nacht bei RT kontaktiert und anschließend fünfmal mit PBS gewaschen.

10

Nach Zugabe von 200 µl PBS+T, gemischt mit Brilliantblau FCF in verschiedenen Konzentrationen, wurde die an die Oberfläche der Küvette gebundene Fluoreszenz von GAMAPC 10 µg/ml in PBS+T und die Fluoreszenz durch Volumenanregung gemessen.

15

Tabelle 5

Zugegebener Farbstoff in PBS+T	Konzentration des Farbstoffs [mM]	Emission des Fluorophors [Fluoreszenzcounts/s]
keine (nur Küvette)	--	3.300
keine (Küvette + GAM APC)	--	126.000
GAMAPC(geb.) + Brilliant-Blue FCF ⁵⁾	0,02	115.000
GAMAPC(geb.) + Brilliant-Blue FCF ⁵⁾	0,04	94.000
GAMAPC(geb.) + Brilliant-Blue FCF ⁵⁾	0,08	74.000
GAMAPC(geb.) + Brilliant-Blue FCF ⁵⁾	0,16	56.000
GAMAPC(geb.) + Brilliant-Blue FCF ⁵⁾	0,32	42.000
GAMAPC(geb.) + Brilliant-Blue FCF ⁵⁾	0,63	29.000
GAMAPC(geb.) + Brilliant-Blue FCF ⁵⁾	1,25	19.000
GAMAPC(geb.) + Brilliant-Blue FCF ⁵⁾	2,50	12.000
GAMAPC(geb.) + Brilliant-Blue FCF ⁵⁾	5,0	9.000
GAMAPC(geb.) + Brilliant-Blue FCF ⁵⁾	10,0	8.000

Anmerkung: ⁵⁾ Brilliant-Blue FCF (Erioglaucine A), Fluka, Buchs, CH

Es wurde eine von der Konzentration des Farbstoffs im Volumen abhängige Reduktion der Evaneszenzfeldanregung des gebundenen APC festgestellt. Bei Brilliantblau-Konzentrationen von 0,04 mM sind etwa 35% der gebundenen 5 Fluoreszenz gelöscht, d.h. die Reduktion der gebundenen Fluoreszenz ist wesentlich geringer als die Reduktion der Fluoreszenz durch Volumenanregung, wo mehr als 95% der Fluoreszenz durch die Farbstoffzugabe in der gleichen Konzentration gelöscht wurden.

10

Beispiel 6

Dieses Beispiel zeigt, daß die Emission der Fluorophore, welche an der Oberfläche gebunden sind, durch die zugegebene Menge Farbstoff nicht wesentlich 15 inhibiert wird, während die Volmenanregung stark reduziert ist. Daraus folgt ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis und deshalb niedrigere Nachweisgrenzen. Eine wie bei Beispiel 1a) präparierte Küvette wird mit GAMAPC in PBS+T über Nacht bei RT kontaktiert und anschließend fünfmal mit PBS gewaschen. Dann wurde wie in Beispiel 1b) GAMAPC in PBS+T über Nacht bei RT auf der Oberfläche 20 belassen. Anschließend wurde fünfmal mit PBS gewaschen.

Die so präparierten Küvetten wurden den folgenden, verschiedenen Fluoreszenzmessungen unterworfen:

- 25 (1) Nach Zugabe von PBS+T (nur gebundenes Fluorophor)
- (2) Nach Zugabe von APC (10 µg/ml in PBS+T) (gebundenes Fluorophor + Fluorophor im Volumen, aber ohne Farbstoff)
- (3) Nach Zugabe von APC 10 µg/ml und Brilliantblau FCF (BB FCF) (0,25 mM in PBS+T) (gebundenes Fluorophor + Fluorophor im Volumen + Farbstoff)

30

Tabelle 6

Chip	Mab µg/ml	GAMAPC µg/ml	Emission [Fluoreszenzcounts / s]		
			(1) PBS+T	(2) PBS+T APC 10 µg/ml	(3) PBS+T APC 10 µg/ml BB FCF 0,25 mM
M1	0	10	3.000	230.000	5.000
M2	5	10	120.000	300.000	59.000
M3	5	3	72.000	280.000	29.000
M4	5	1	26.000	170.000	16.000
M5	5	0,3	5.500	230.000	7.200
M6	5	0,1	4.600	230.000	6.000

Tabelle 7

Chip	Signal/Rausch-Verhältnis ⁶⁾	
	(2) ohne Brilliantblau FCF	(3) mit Brilliantblau FCF
M1 ⁷⁾	---	---
M2	1,3	11,8
M3	1,2	5,8
M4	0,7	5,8
M5	1,0	3,2
M6	1,0	1,2

5

Anmerkungen:

⁶⁾ Signal/Rausch-Verhältnis = Verhältnis der Oberflächenemission („Signal“) zur Volumenemission („Rauschen“)

⁷⁾ Rauschen = Chip M1 - negative Reaktion (negative Kontrolle)

10

Ergebnisse:

1. Abnehmende Konzentrationsreihe GAMAPC von M2 nach M6. Die negative Kontrolle M1 weist eine Emission in Höhe von 3.000 counts/s auf.

2. Ohne die Zugabe eines Farbstoffs, d.h. mit nicht gelöschter APC-Anregung im Volumen, ist keine eindeutige abnehmende Konzentrationsreihe von M2 nach M6 erkennbar. Vor allem geringe Werte verschwinden im Hintergrund der Volumenanregung.

5 3. Mit Brilliantblau FCF im Volumen ist die abnehmende Konzentrationsreihe M2 nach M6 deutlich erkennbar. Die negative Kontrolle M1 weist 5.000 counts/s auf. Durch Brilliantblau FCF reduziert sich die Emission des Volumens durch APC von 230.000 counts/s M1 auf 5.000 counts/s.

10 Die spezifische oberfächengebundene Fluoreszenz ist um etwa 50% reduziert. Das Signal/Rausch-Verhältnis ist bei Zugabe von Brilliantblau FCF wesentlich verbessert.

15 Beispiel 7

In diesem Beispiel wurden Reaktionskinetiken der Anlagerung eines fluorophor-markierten Proteins an einen auf der Oberfläche der Küvette gebundenen Reaktionspartner gemessen.

20 In eine wie in Beispiel 1a) preparierte Küvette wurden GAMAPC in PBS+T zugegeben, und die Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

25 Fig. 7 zeigt die Änderung der Emission gegen die Zeit. Die Zugabe von GAMAPC erfolgte bei $T = 100$ s. Es wird eine Zunahme der Emission (Fluoreszenzcounts) mit der Reaktionszeit beobachtet, welche der Anlagerung des Fluorophor-markierten Proteins an den auf der Oberfläche gebundenen Reaktionspartner entspricht.

30 Zum Vergleich wurde die Änderung der Emission mit der Zeit bei einer Probe gemessen, bei der die Oberfläche der Küvette nicht mit gemäß Beispiel 1 a) mit Mouse-1gG beschichtet war (vgl. Fig. 8). Die Emission nahm mit der Zeit nicht zu, sondern blieb stabil.

Ansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Substanzen, umfassend die Schritte
 - Bereitstellen einer Oberfläche, welche mindestens einen Reaktionspartner R^1 für einen Reaktionspartner R^2 an der Oberfläche gebunden umfaßt,
 - Kontaktieren der Oberfläche mit einer Lösung, welche mindestens die zu bestimmende Substanz, mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung und mindestens einen Farbstoff, welcher im Absorptions- und/oder Emissionsbereich des Fluorophors absorbiert, umfaßt, worin sich an dem Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche mittels des Reaktionspartners R^2 ein Komplex ausbildet und worin dieser Komplex neben dem Reaktionspartner R^1 mindestens die zu bestimmenden Substanz und die mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung umfaßt, und
 - Anregen des auf der Oberfläche gebundenen Fluorophors durch das Evaneszenzfeld einer Lichtquelle und Messen der erzeugten Fluoreszenz.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die zu bestimmende Substanz als Reaktionspartner R^2 an den Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche bindet.
3. Verfahren nach Anspruch 2, worin der an der Oberfläche gebundene Reaktionspartner R^1 ein Antigen oder ein Antikörper ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, worin eine weitere Verbindung, welche eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz aufweist und einen Reaktionspartner R^2 enthält, an den Reaktionspartner R^1 auf der Oberfläche bindet.

5. Verfahren nach Anspruch 4, worin der Reaktionspartner R¹ Avidin oder Streptavidin umfaßt und der Reaktionspartner R² Biotin und eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz umfaßt.

5

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die zu bestimmende Substanz eine biologisch aktive Substanz umfaßt, welche aus der Gruppe Hormone, Proteine, Viren, Bakterien, Pharmazeutika und Toxine ausgewählt ist.

10

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die zu bestimmende Substanz ein Protein, vorzugsweise ein Antigen oder einen Antikörper, umfaßt.

15

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Fluorophor-haltige Verbindung eine fluoreszierende Verbindung und eine Bindungsstelle für die zu bestimmende Substanz aufweist.

20

9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin als Fluorophor fluoreszierende Proteine und/oder niedermolekulare fluoreszierende chemische Verbindungen verwendet werden.

25

10. Verfahren nach Anspruch 9, worin als fluoreszierende Proteine Phycobiliproteine, wie Allophycocyanin (APC), CryptoFluor Crimson oder CryptoFluor Red, verwendet werden.

11. Verfahren nach Anspruch 9, worin als niedermolekulare fluoreszierende Verbindungen Cy5 oder BODIPY verwendet werden.

30

12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin mindestens ein Fluorophor verwendet wird, welcher in einem Wellenlängenbereich von 600 bis 700 nm absorbiert.

13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin mindestens

eine phosphorelierende Verbindung als Fluorophor verwendet wird.

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin eine Mischung von Farbstoffen verwendet wird, welche im Absorptions- und/oder

5 Emmisionsbereich des Fluorophors absorbieren.

15. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin mindestens ein Farbstoff verwendet wird, welcher in einem Wellenlängenbereich von 600 bis 700 nm absorbiert.

10

16. Verfahren nach Anspruch 15, worin als der mindestens eine Farbstoff Brilliantblau FCF in einer Konzentration von mindestens 0,001 mM verwendet wird.

15 17. Küvette oder Mikrotiterplatte zur Verwendung in dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, welche mindestens einen Reaktionspartner für die zu bestimmende Substanz an einer Oberfläche gebunden umfaßt.

18. Küvette oder Mikrotiterplatte nach Anspruch 17, wobei der mindestens eine 20 Reaktionspartner R¹ in lyophilisierter Form vorliegt.

19. Küvette oder Mikrotiterplatte nach Anspruch 17 oder 18, wobei die Küvette einen Kunststoff, vorzugsweise Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Polyacrylnitril, Polymethylmethacrylat, Polycycloolefin, Polyethylenterephthalat und/oder Mischungen derselben umfaßt.

25 20. Küvette oder Mikrotiterplatte nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei die Küvette oder Mikrotiterplatte einteilig ist.

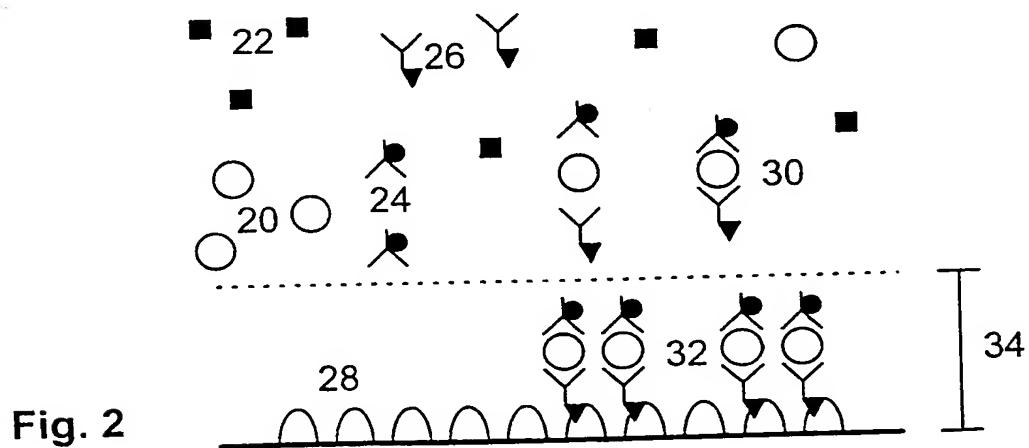
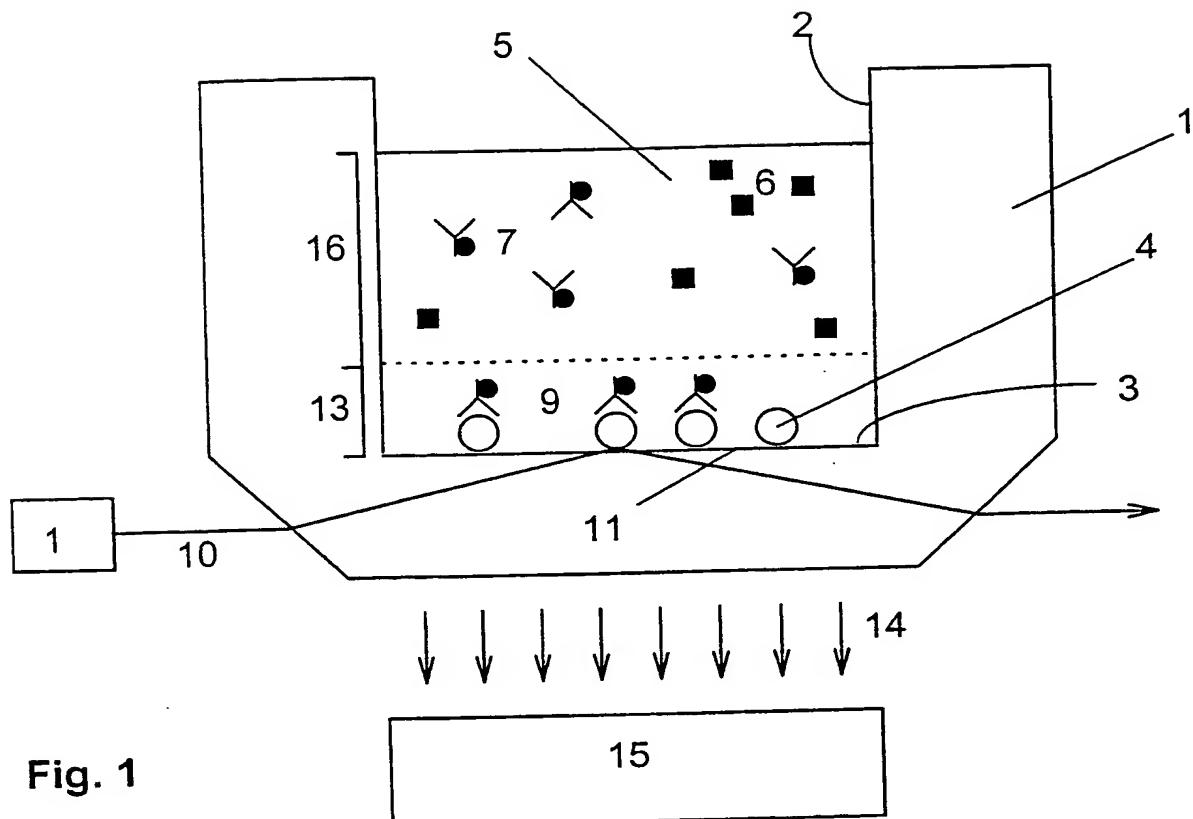
30 21. Küvette nach einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei die Küvette ein Reaktionsvolumen von 1 bis 400 µl aufweist.

22. Lösung, enthaltend mindestens eine Fluorophor-haltige Verbindung, mindestens einen Farbstoff und gegebenenfalls einen Reaktionspartner R²

zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16.

23. Kit zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, umfassend mindestens eine Küvette oder Mikrotiterplatte nach einem 5 der Ansprüche 17 bis 21, und/oder mindestens eine Lösung nach Anspruch 22.
24. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 16, zur Bestimmung von Reaktionskinetiken immunologischer Reaktionen. 10
25. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 16 in der medizinischen oder veterinärmedizinischen Diagnostik, der Lebensmittelanalytik, der Umweltanalytik oder der Analytik von Fermentationsprozessen.

1/6



ERSATZBLATT (REGEL 26)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/6

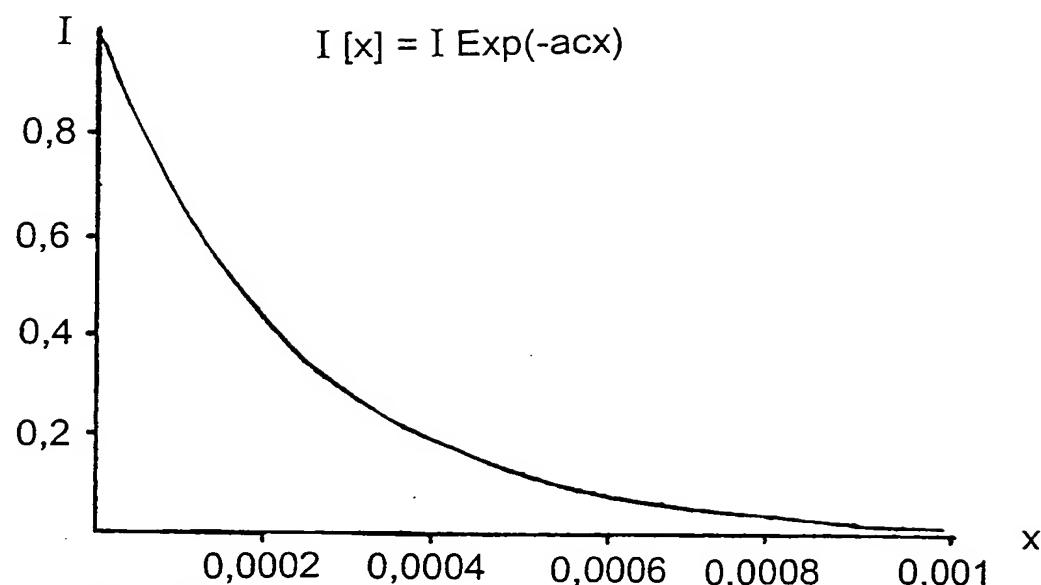


Fig. 3

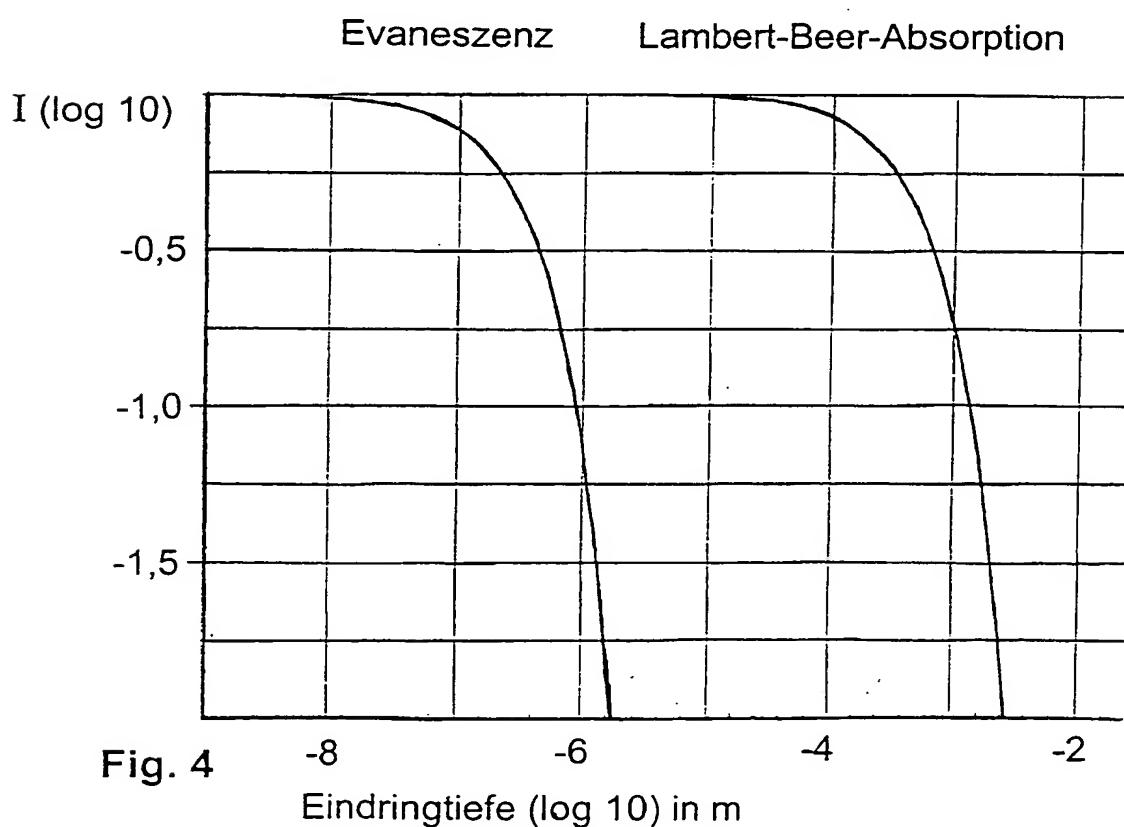
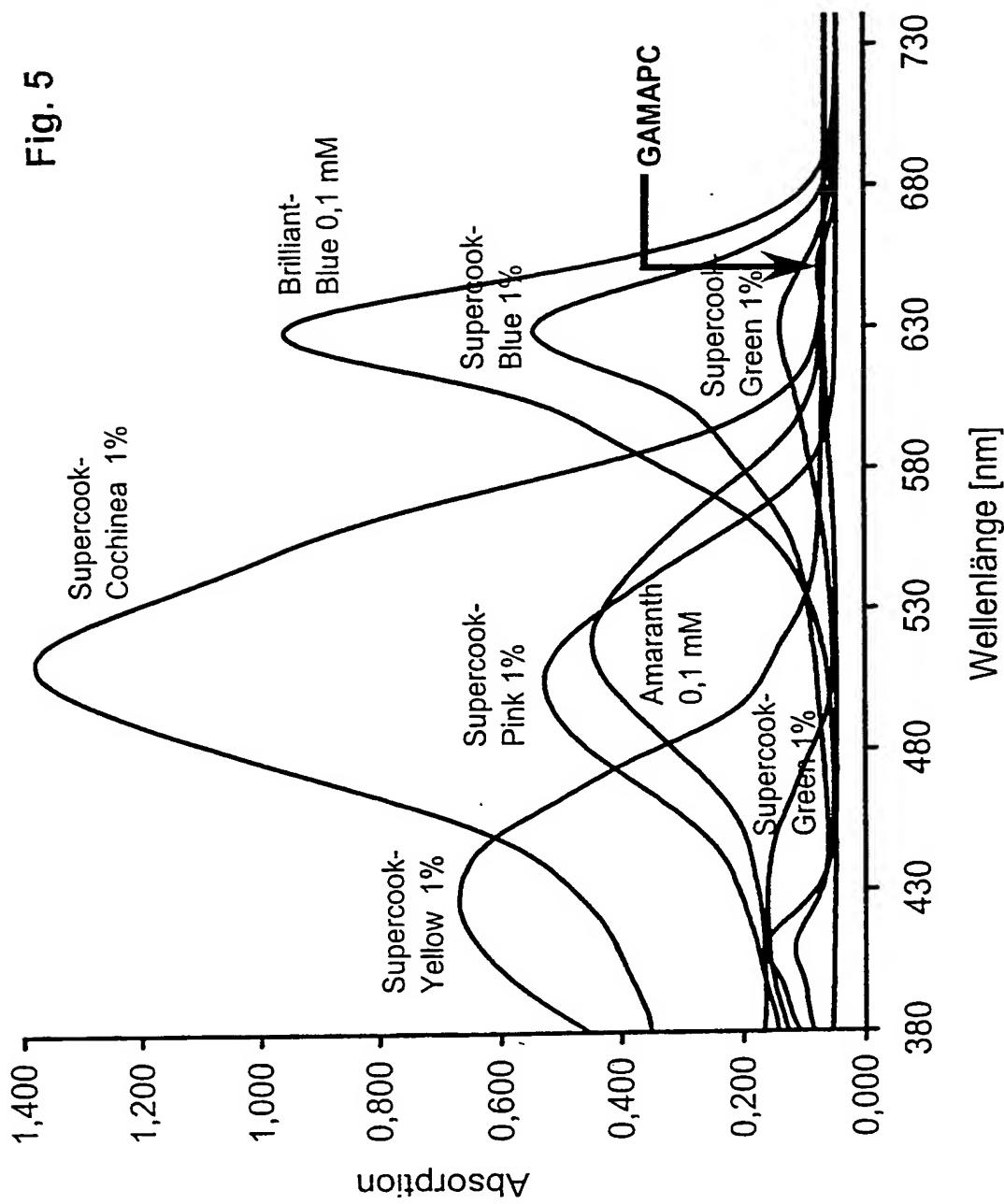


Fig. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/6

Fig. 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/6

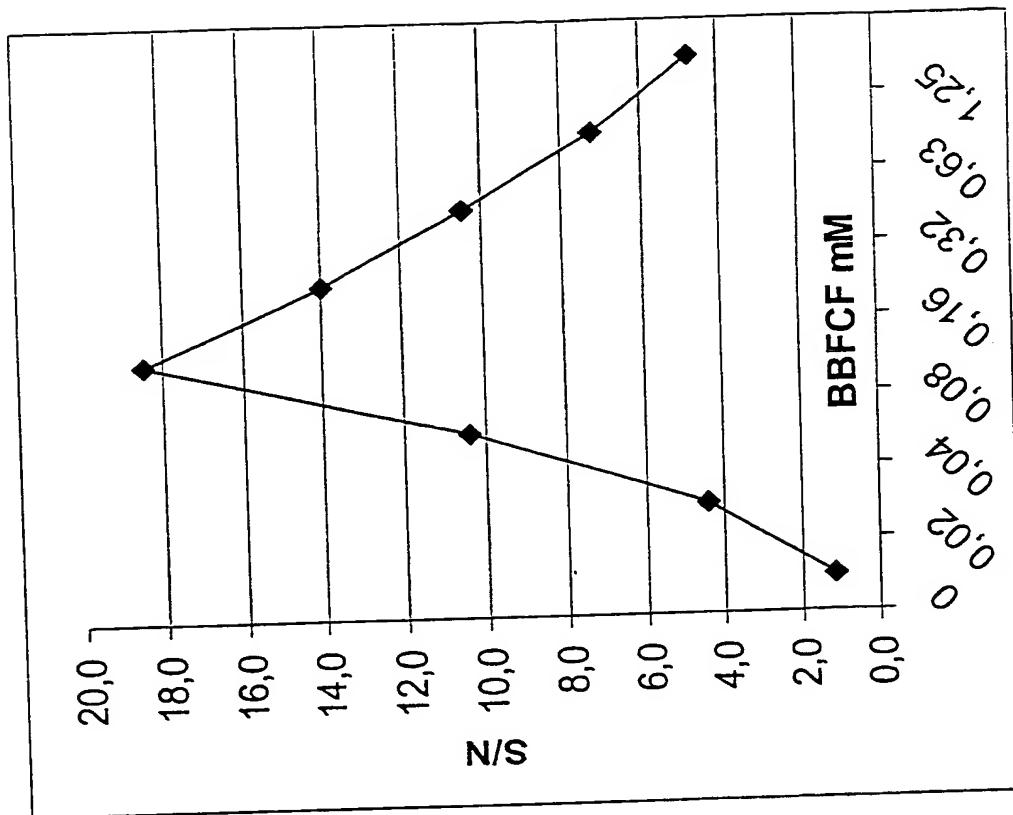


Fig. 6b

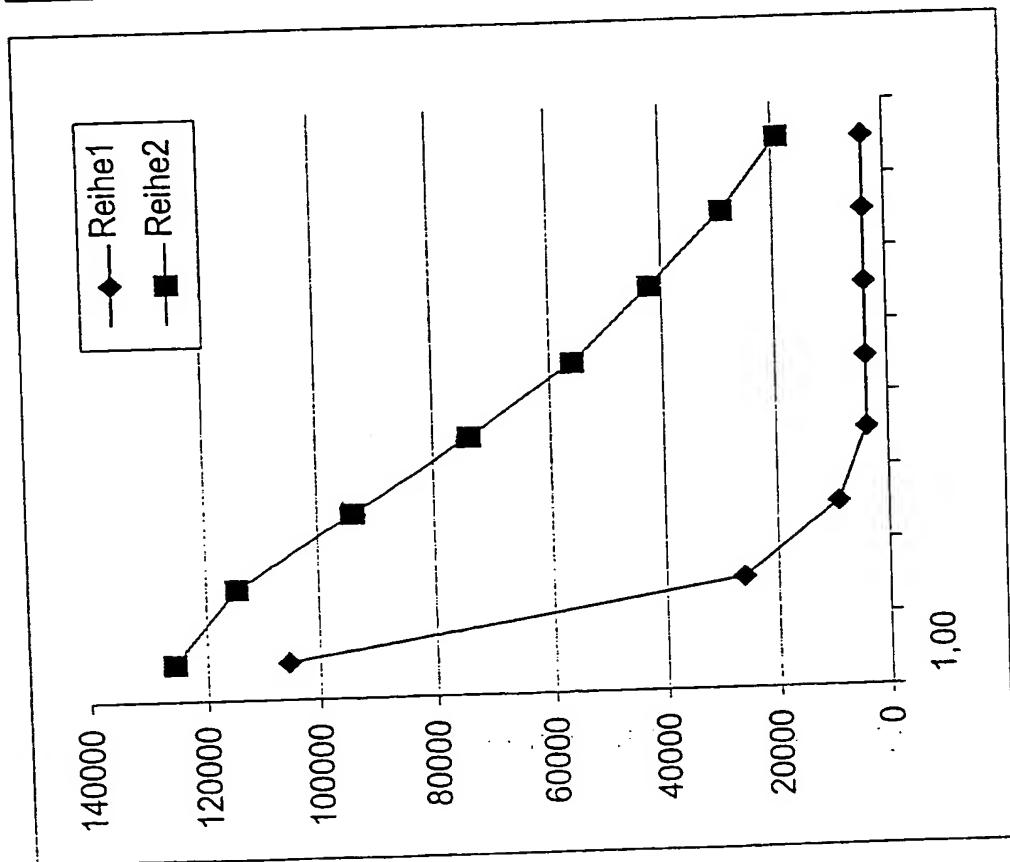


Fig. 6a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/6

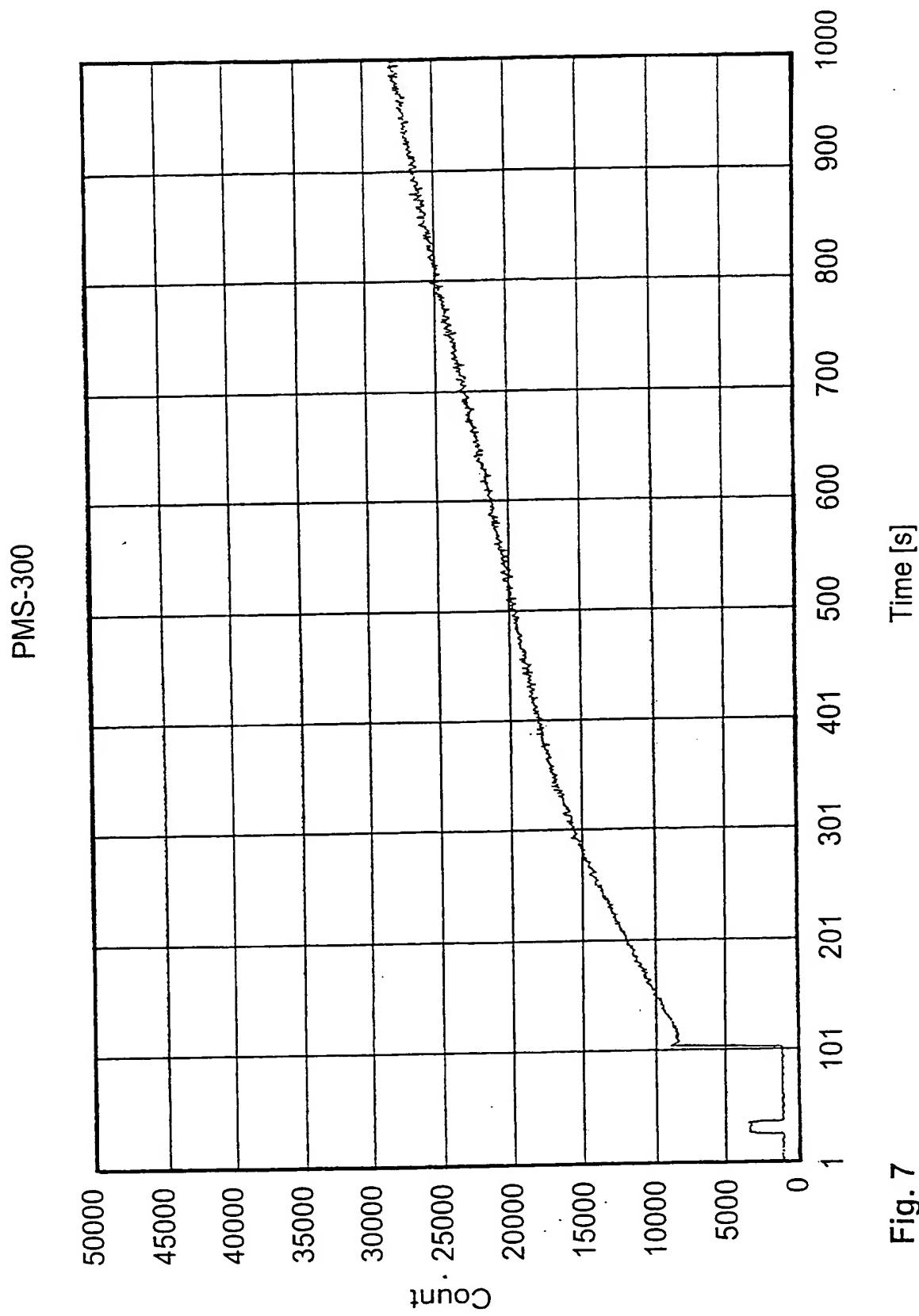
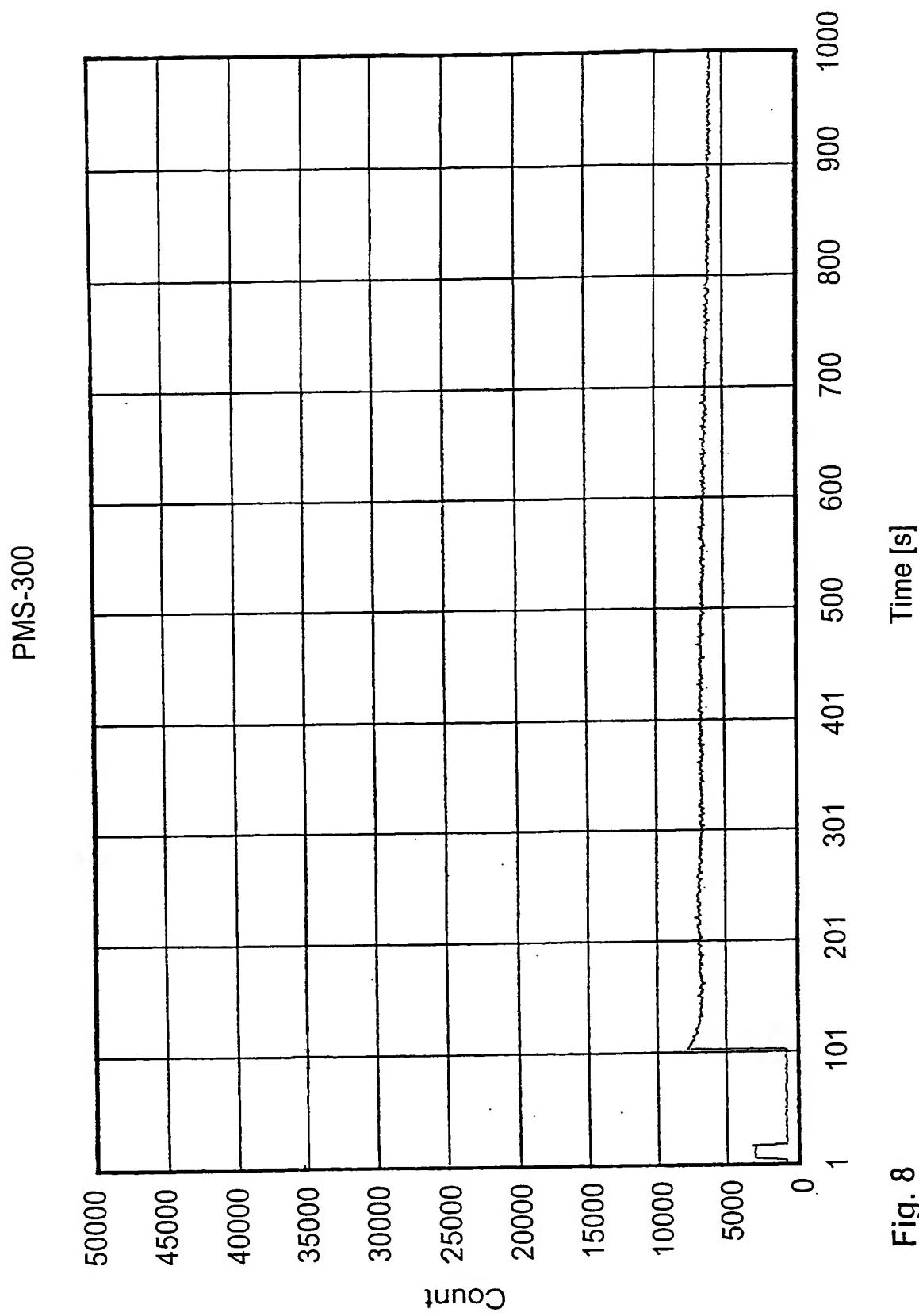


Fig. 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr Application No
PCT/EP 00/08116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N21/55

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, INSPEC, COMPENDEX, IBM-TDB, FSTA, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 451 434 A (HART) 29 May 1984 (1984-05-29) column 4, line 62 -column 5, line 31 figures 5,6 ---	1-4,6-9, 17,20, 22-25
A	US 5 300 423 A (ZOHA) 5 April 1994 (1994-04-05) column 5, line 55 -column 6, line 24 column 7, line 1 - line 3 column 7, line 12 - line 14 figure 3 --- -/-	1-4,6-9, 13

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 January 2001

Date of mailing of the international search report

11/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thomas, R.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No	PCT/EP 00/08116
------------------------------	-----------------

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 96 09532 A (ABBOTT LABORATORIES) 28 March 1996 (1996-03-28)</p> <p>page 1, paragraphs 1,2 page 2, line 4 - line 5 page 10, line 3 - line 9 page 12, line 29 - line 34 page 21, line 30 -page 22, line 29 column 23, line 4 - line 12 column 30, last line -column 31, line 2; figure 1</p> <p>-----</p>	1-4,6-9, 17,22-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08116

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 4451434	A	29-05-1984	US	4271139 A	02-06-1981
			DE	2912089 A	11-10-1979
			GB	2032101 A, B	30-04-1980
			IT	1193295 B	15-06-1988
			JP	54157680 A	12-12-1979
			JP	63001545 B	13-01-1988
			US	4382074 A	03-05-1983
			US	4388296 A	14-06-1983
<hr/>			<hr/>		
US 5300423	A	05-04-1994	US	5192510 A	09-03-1993
			CA	2059394 A	31-07-1992
			WO	9318405 A	16-09-1993
<hr/>			<hr/>		
WO 9609532	A	28-03-1996	US	5599668 A	04-02-1997
			AU	3636295 A	09-04-1996
			CA	2197321 A	28-03-1996
			EP	0783683 A	16-07-1997
			JP	10506190 T	16-06-1998
			US	5843651 A	01-12-1998
<hr/>			<hr/>		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08116

A. KLASSEFIZIERTUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 GO1N21/55

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 GO1N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, INSPEC, COMPENDEX, IBM-TDB, FSTA, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 451 434 A (HART) 29. Mai 1984 (1984-05-29) Spalte 4, Zeile 62 -Spalte 5, Zeile 31 Abbildungen 5,6 ---	1-4,6-9, 17,20, 22-25
A	US 5 300 423 A (ZOHA) 5. April 1994 (1994-04-05) Spalte 5, Zeile 55 -Spalte 6, Zeile 24 Spalte 7, Zeile 1 - Zeile 3 Spalte 7, Zeile 12 - Zeile 14 Abbildung 3 --- -/-	1-4,6-9, 13

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiteilhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

4. Januar 2001

11/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thomas, R.M.

INTERNATIONALES suchERCHENBERICHT

nales Aktenzeichen
PCT/EP 00/08116

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 96 09532 A (ABBOTT LABORATORIES) 28. März 1996 (1996-03-28) Seite 1, Absätze 1,2 Seite 2, Zeile 4 - Zeile 5 Seite 10, Zeile 3 - Zeile 9 Seite 12, Zeile 29 - Zeile 34 Seite 21, Zeile 30 -Seite 22, Zeile 29 Spalte 23, Zeile 4 - Zeile 12 Spalte 30, letzte Zeile -Spalte 31, Zeile 2; Abbildung 1 -----	1-4,6-9, 17,22-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen
PCT/EP 00/08116

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
US 4451434	A	29-05-1984	US	4271139 A	02-06-1981
			DE	2912089 A	11-10-1979
			GB	2032101 A, B	30-04-1980
			IT	1193295 B	15-06-1988
			JP	54157680 A	12-12-1979
			JP	63001545 B	13-01-1988
			US	4382074 A	03-05-1983
			US	4388296 A	14-06-1983
US 5300423	A	05-04-1994	US	5192510 A	09-03-1993
			CA	2059394 A	31-07-1992
			WO	9318405 A	16-09-1993
WO 9609532	A	28-03-1996	US	5599668 A	04-02-1997
			AU	3636295 A	09-04-1996
			CA	2197321 A	28-03-1996
			EP	0783683 A	16-07-1997
			JP	10506190 T	16-06-1998
			US	5843651 A	01-12-1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)